

DE ROL VAN RENALE ALPHA-RECEPTOREN BIJ DE REGULATIE VAN  
DE RENINESECRETIE DOOR DE GEISOLEERDE RATTENIER.



DE ROL VAN RENALE ALPHA-RECEPTOREN BIJ DE REGULATIE VAN  
DE RENINESECRETIE DOOR DE GEISOLEERDE RATTENIER.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE  
GENEESKUNDE  
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS  
PROF.DR. B. LEIJNSE  
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.  
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP  
WOENSDAG 5 APRIL 1978 DES NAMIDDAGS  
TE 4.15 UUR PRECIES

DOOR

KAREL DIRK STRANG

GEBOREN TE 's-GRAVENHAGE

PROMOTORES: Prof.Dr. W.H. Birkenhäger  
Dr. R. Vandongen

CO-REFERENTEN: Dr. M.A.D.H. Schalekamp  
Prof.Dr. J.C. Birkenhäger

## INHOUDSOPGAVE

Lijst van afkortingen.	6
Alphabetische lijst van in de tekst voorkomende pharmaca (met korte beschrijving van enige rele- vante eigenschappen).	7
Hoofdstuk I Literatuur overzicht.	12
Hoofdstuk II Verantwoording van het onderzoek.	31
Hoofdstuk III Proefopstelling en technieken.	42
Hoofdstuk IV Het effect van alpha-adrenerge stimulatie op de reninesecretie tijdens experimentele omstandig- heden, waarbij basale condities werden nagestreefd.	50
Hoofdstuk V Het alpha-adrenerge effect op de door isoprote- renol gestimuleerde reninesecretie.	60
Hoofdstuk VI Het alpha-adrenerge effect op de reninesecretie na elimineren van de vaatreactie.	75
Hoofdstuk VII Onderzoek naar inactief renine versus actief renine.	85
Algemene samenvatting.	93
Summary.	96
Lijst van geraadpleegde literatuur.	98

## Lijst van afkortingen

a.	=	arteria
A.I	=	angiotensine I
dih.	=	dihydralazine
E.	=	eenheid
h.	=	hour
iso.	=	isoproterenol, isoprenaline
l.	=	liter, litre
LDH	=	lactaatdehydrogenase
M	=	molair
m	=	milli ( $10^{-3}$ )
min.	=	minuten, minutes
ml.	=	milliliter
mmHg.	=	millimeter kwik
mol.	=	grammolecule
n.	=	nano ( $10^{-9}$ )
P.B.	=	phenoxybenzamine
PCO <sub>2</sub>	=	kooldioxide spanning
P. diast.	=	diastolische druk
P.E.	=	phenylephrine
PO <sub>2</sub>	=	zuurstof spanning
P. syst.	=	systolische druk
S.E.M.	=	standard error of the mean
SGOT	=	serum glutaminezuur-oxaalazijnzuurtransaminase
SGPT	=	serum glutaminezuur-pyrodruivezuurtransaminase
T <sub>x</sub>	=	tijdstip x
T <sub>x</sub> - T <sub>y</sub>	=	tijdsinterval tussen tijdstippen x en y
v.	=	vena

Alphabetische lijst van in de tekst voorkomende pharmaca  
(met korte beschrijving van enige relevante eigenschappen)

Acetazolamide

Koolzuuranhydraseremmer, die vooral op de proximale tubulus inwerkt.

Primair stijgt de uitscheiding van het bicarbonaat anion met als gevolg een versterkte uitscheiding van natrium en kalium. Als gevolg van de werking daalt het bicarbonaat in de extracellulaire vloeistof en ontstaat metabole acidose.

Chlorisondamine

Ganglionblokkerende stof. De blokkade van sympathische ganglia leidt tot een verminderde tonus in arteriolae en venen.

Chlorothiazide

Behoort tot de groep van de benzothiadiazide diuretica. Deze diuretica werken voornamelijk zo niet uitsluitend door remming van de reabsorptie van natrium en chloride in het distale tubulus segment. Zij hebben tevens een belangrijke werking op de kaliumuitscheiding.

Clonidine

Antihypertensivum. Na toediening volgt eerst een korte stijging van de bloeddruk gevolgd door een langer aanhoudende daling van de bloeddruk. Het initiële pressor-effect ontstaat door directe stimulatie van perifere alpha adrenerge receptoren. Het pharmacon leidt tevens tot alpha adrenerge blokkade door competitieve inhibitie. De bloeddrukdaling en bradycardie worden veroorzaakt door een werking op het centrale zenuwstelsel.

Diazoxide

Is chemisch nauw verwant met de thiazide diuretica. Het heeft een snelle bloeddrukverlagende werking door direct

aan te grijpen op de tonus in de arteriolae. Een snelle intraveneuze injectie geeft een snelle daling van systolische en diastolische druk met een toegenomen hartminutenvolume en tachycardie. Het effect van diazoxide op de electrolyt- en waterbalans is tegengesteld aan dat van de thiazide diuretica. Het veroorzaakt namelijk een aanzienlijke retentie van natrium en water.

#### Dihydralazine

Vergelijkbaar met hydralazine.

#### Epinephrine (adrenaline)

Een catecholamine met effecten op zowel alpha- als bèta-receptoren. Van bijzonder belang is de werking op het hart en gladde spieren, onder andere in de vaatwand. Na enkelvoudige toediening heeft het een bloeddrukverhogend effect. De toename in systolische druk is groter dan die van de diastolische druk met als gevolg een toegenomen polsdruk. Later volgt een tijdelijke bloeddrukdaling tot onder de uitgangswaarde.

De toegenomen druk wordt veroorzaakt door een positief inotroop en chronotroop effect op het hart en een vasoconstrictie waaraan ook de niervaten meedoen. De nierdoorbloeding neemt af.

Kleine doses kunnen de bloeddruk doen dalen. Deze daling wordt evenals de biphasische respons op een grotere dosis toegeschreven aan een grotere gevoeligheid van de vasodilaterende bètareceptoren dan van de constrictie-bevorderende alphareceptoren. Bij hogere doses blijkt de stimulatie van alpha- en bètareceptoren te resulteren in vasoconstrictie.

#### Etacrynezuur

Snel en kortwerkend diureticum. Het werkt voornamelijk door het remmen van natrium- en chloorreabsorptie in het opstijgende been van de lis van Henle. Ook is remming van electrolytenreabsorptie waargenomen in de proximale tubulus.



### Frusemide (furosemide)

Snel en kortwerkend diureticum. Remt de natrium- en chloorreabsorptie in het opstijgende been van de lis van Henle.

### Heparine

Anticoagulans met een snelle werking. Remt de stolling van het bloed zowel in vitro als in vivo.

### Hydralazine

Bloeddrukverlagend middel. Het veroorzaakt een directe relaxatie van de vasculaire gladde spier. De bloeddruk daalt, de tachycardie die ontstaat is waarschijnlijk reflectoir ten gevolge van de bloeddrukdaling. De nierdoorbloeding neemt toe, tenzij de bloeddrukdaling te groot is.

### Isoproterenol

Sympathicomimeticum dat bijna uitsluitend de bètareceptoren stimuleert. De perifere vaatweerstand daalt, voornamelijk in de skeletspieren. De diastolische bloeddruk daalt. Het hartminutenvolume neemt toe; onder andere door een positief chronotroop en inotroop effect.

### Ketamine

Anestheticum dat een verhoogde spiertonus veroorzaakt. Bloeddruk, hartminutenvolume en hartfrequentie nemen toe. De haemodynamische effecten worden toegeschreven aan een stimulatie van het adrenergische systeem.

### Mannitol

Osmotisch diureticum, dat zijn werking ontleent aan het onttrekken van vloeistof aan de terugresorptie door de tubulus.

### Methoxamine

Sterk werkzame alphareceptor-stimulerende stof, met nauwelijks effect op de bètareceptor. Werkt bloeddruk-verhogend door vasoconstrictie. De reflexmatige bradycardie is meer uitgesproken dan die bij phenylephrine. De nierdoorbloeding wordt verminderd.

### Natriumsulfaat

Osmotisch diureticum.

### Norepinephrine (noradrenaline)

Evenals epinephrine een natuurlijk voorkomend catecholamine. De werking verschilt van die van epinephrine, doordat de verhouding tussen alpha- en bètareceptor-stimulatie anders ligt. Norepinephrine werkt voornamelijk op alphareceptoren en weinig op bètareceptoren. De vaatweerstand, de systolische en de diastolische bloeddruk nemen toe. De nierdoorbloeding daalt.

### Pentobarbital

Een barbituraat met betrekkelijk korte werkingstijd. Is te gebruiken als sedativum of anestheticum.

### Phenoxybenzamine

Pharmacon met alpha-adrenerg blokkerende werking door middel van competitieve inhibitie in de eerste fase van blokkade. Nadat blokkade eenmaal heeft plaats gevonden wordt dit niet meer beïnvloed door stoffen met affiniteit voor dezelfde receptoren. Dit wordt veroorzaakt door een hechte binding tussen de antagonist en de receptor. De bloeddruk toont gewoonlijk een geringe daling, die duidelijker wordt bij staande houding. De perifere weerstand neemt af. In rust verandert de nierdoorbloeding weinig.

### Phentolamine

Een pharmacon met een competitieve alpha-adrenerg blokkerende werking. Het veroorzaakt vasodilatatie en stimuleert de hart-

functie. De bloeddrukreactie varieert met de relatieve bijdrage van beide bovenstaande effecten. Gewoonlijk is er echter een daling van de bloeddruk.

#### Phenylephrine

Sterk werkzame alphareceptorstimulerende stof met gering effect op de bètareceptor. De bloeddruk wordt aanzienlijk verhoogd door vasoconstrictie, gepaard gaande met een geringe reflectoire bradycardie. De nierdoorbloeding wordt verminderd.

#### Propranolol

Bèta-adrenerg blokkerende stof zonder intrinsieke sympathicomimetische activiteit. De (l)vorm heeft een goede bèta-blokkerende werking, daarentegen heeft de (d)vorm minder dan 1% van de blokkerende werking van de (l)vorm. De belangrijkste werking is die op de bèta-receptoren in de hartspier. Het hartminutenvolume en de hartfrequentie dalen. Bij acute toediening daalt de bloeddruk nauwelijks. Door compensatoire sympathische reflexen en wellicht ook door perifere bèta-blokkade neemt de perifere weerstand toe. De nierdoorbloeding neemt af. Bij chronische toediening is er veelal een geleidelijke afname in bloeddruk, mogelijk doordat de reflectoir toegenomen perifere weerstand afneemt.

#### Theophylline

Xanthine-derivaat.

Het middel stimuleert de hartspier (positief chronotroop en inotroop effect), leidt tot relaxatie van de gladde spieren, vooral in de bronchi. Voorts stimuleert het onderdelen van de hersenfunctie. Tenslotte heeft het middel een diuretische werking, die waarschijnlijk niet uitsluitend op het cardiale effect berust maar ten dele samenhangt met een direct effect op de tubuli.

#### Ureum

Osmotisch diureticum. Zie Mannitol.

## Hoofdstuk I

### Literatuur overzicht

- 1) De werking van renine.
- 2) De localisatie van renine.
- 3) Factoren welke de renine-secretie beïnvloeden
  - a) De baroreceptor
  - b) De macula densa
  - c) Het sympathisch zenuwstelsel
  - d) Humorale factoren

## Hoofdstuk I

### Literatuur overzicht

#### 1. De werking van renine

In 1898 beschreven Tigerstedt en Bergman een bloeddruk-verhoging welke ontstond wanneer een ruw extract van konijnennieren werd ingespoten bij een ander konijn. Het veronderstelde werkzame bestanddeel noemden zij renine.

Goldblatt bracht de nier onder de aandacht bij de pathogenese van hypertensie in zijn klassieke proeven met honden, waarbij met behulp van afklemmen van de a.renalis een renale ischaemie werd bewerkstelligd, gevolgd door hypertensie (Goldblatt, 1934). Verder toonde hij aan (Goldblatt, 1937), dat de aldus ontstane hypertensie niet kon worden voorkomen door sympathectomie. Transplantatie van de nier naar de nek of lies maakte het nog steeds mogelijk met deze nier een "cliphypertensie" te veroorzaken (Blalock en Levy, 1937; Glenn et al., 1937). Bovenstaande experimenten wezen op een pressor-substantie vanuit de nier.

Onderzoek naar zuivering van de verantwoordelijke stof, het renine, werd onder andere gedaan door Helmer en Page in 1939 en Pickering en Prinzmetal in 1938. Het renine heeft zelf geen directe pressor-activiteit, maar maakt vanuit het plasma een vasoconstrictoire substantie vrij (Page en Helmer, 1940; Braun-Menendez, 1940).

De structuur van het renine is nog steeds niet geheel opgehelderd. Het is een proteolytisch enzym met een molecuulgewicht van  $\pm 40.000$ . Er is in de literatuur ook sprake van een (relatief) inactieve vorm van renine, dat door in vitro verlagen van de pH kan worden omgezet in het kleinere molecuul, actief renine (Lumbers, 1971; Skinner et al., 1975; Day et al., 1975; Leckie en

McConnell, 1975; Derkx et al., 1976; Boyd, 1977).

De halfwaardetijd van renine bedraagt ongeveer 15 tot 20 minuten (Ziegler en Gross, 1963), hetgeen een aanwijzing is voor een minuut op minuut regulatie; dit is in overeenstemming met bijvoorbeeld de acute veranderingen in reninesecretie bij houdingsverandering. Zowel lever en nieren lijken actief te zijn bij het elimineren van renine (Leloir et al., 1942).

Het renine werkt in op het reninesubstraat, een  $\alpha$ 2-globuline met een molecuulgewicht van  $\pm 60.000$ , dat door de lever wordt gesynthetiseerd.

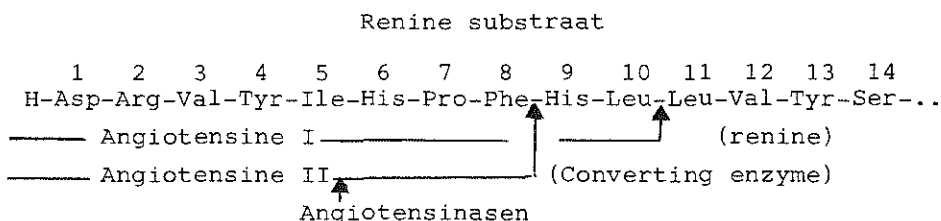
Hierbij wordt de leucyl-leucine verbinding gekliefd, welk de decapeptide angiotensine I verbindt met de rest van het substraat. Vervolgens zet het convertings enzyme, dat voornamelijk in de long, maar ook in plasma en verschillende weefsels aanwezig is het angiotensine I om in de octapeptide angiotensine II. Het angiotensine II is een sterke vasoconstrictor en stimuleert de aldosteronsecretie (Laragh et al., 1960; Carpenter et al., 1961; Peart, 1975; Skeggs et al., 1976).

Ook de heptapeptide angiotensine III (des-asp<sup>1</sup>-angiotensine II) is mogelijk biologisch actief. De vasoconstrictoire eigenschap is veel geringer dan die van angiotensine II, het heeft echter een sterk stimulerend effect op de aldosteronsecretie. Het is mogelijk dat angiotensine II zijn werking op de bijnierschors uitoefent na omzetting in angiotensine III (Chiu en Peach, 1974; Peach en Chiu, 1974; Campbell et al., 1974; Kono et al., 1975).

Zowel angiotensine I als angiotensine II worden snel afgebroken door angiotensinasen.

Hodge (1967) toonde aan dat de halfwaardetijd van angiotensine II minder dan één circulatietijd bedroeg.

### Schematisch overzicht:



Het bovenstaand systeem van interactie is bekend als het renine-angiotensine-aldosteron systeem.

Uit waarnemingen bij gedecapiteerde en gedespinaliseerde honden is gebleken, dat een acute daling van de bloeddruk het renine-angiotensine systeem zodanig kan stimuleren, dat deze daling voor ongeveer 65% weer ongedaan wordt gemaakt (Cowley et al., 1971). Op korte termijn is dit systeem snel in staat belangrijk bij te dragen tot de homeostase van de bloeddruk.

Het systeem komt langzamer in actie dan dat van het baroreceptor-mechanisme, maar werkt sneller dan het zogenaamde Selkurt-mechanisme (verlaging van de nierperfusiedruk → vermindering van de natriumexcretie = water en zoutretentie). De proeven van Cowley toonden aan, dat reeds na 1 minuut na het aanbrengen van een nierarterie-stenose een effect op de bloeddruk kon worden geregistreerd, met een maximum na  $\pm 20$  minuten.

De onder normale omstandigheden aanwezige concentratie angiotensine II in het bloed is zeer waarschijnlijk in staat de bloeddruk te beïnvloeden (Worcel et al., 1969; Chinn en Düsterdieck, 1972).

### 2. De localisatie van renine

Het renine ligt opgeslagen in cytoplasmatische granulae

in de juxtaglomerulaire cellen, die zich bevinden in de media van de afferente arteriole van de glomerulaire vasculaire pool.

Goormaghtigh veronderstelde reeds in 1939 dat deze juxtaglomerulaire cellen de pressorsubstantie, het renine, zouden bevatten, gezien de eigenschappen passend bij een secernerende cel en het toenemen van de granulatie bij ischaemie van de nier. Dit wordt aannemelijk wanneer men de resultaten van de volgende experimenten beschouwd.

- a) Het renine-gehalte in de nier neemt af van de buitenste cortex naar medullair met uitzondering van de subcapsulaire buitenste cortex, waar het renine-gehalte laag is. In de medulla waar zich geen glomeruli bevinden, wordt geen renine gevonden.

Het distributiepatroon van renine en glomeruli komt overeen, ofschoon de gradient bij de glomeruli milder is, wijzend op een grotere hoeveelheid renine in de buitenste cortex per glomerulus. Bij dissectie van glomeruli werd aangetoond dat, ofschoon er een aanzienlijke individuele variatie aan renine-gehalte bestond, het patroon vast lag, in die zin, dat de oppervlakkig gelegen glomeruli meer renine bevatten dan de dieper gelegen glomeruli (Cook et al., 1957; Brown et al., 1963, 1966; Gavras et al., 1970; Rojo Ortega et al., 1970, 1970; Horiuchi et al., 1971).

- b) Tobian et al. (1959) toonden aan, dat normale rattenieren en nieren met een artificiëel vernauwde nierarterie veel granulae in de juxtaglomerulaire cellen bevatten en veel renine bevatten. Dit in tegenstelling tot de bevindingen bij de contra laterale nier bij ratten met unilaterale renale hypertensie en bij de nieren van ratten met desoxycorticosteron-hypertensie, bij deze nieren was weinig of geen granulatie of renine aantoonbaar.



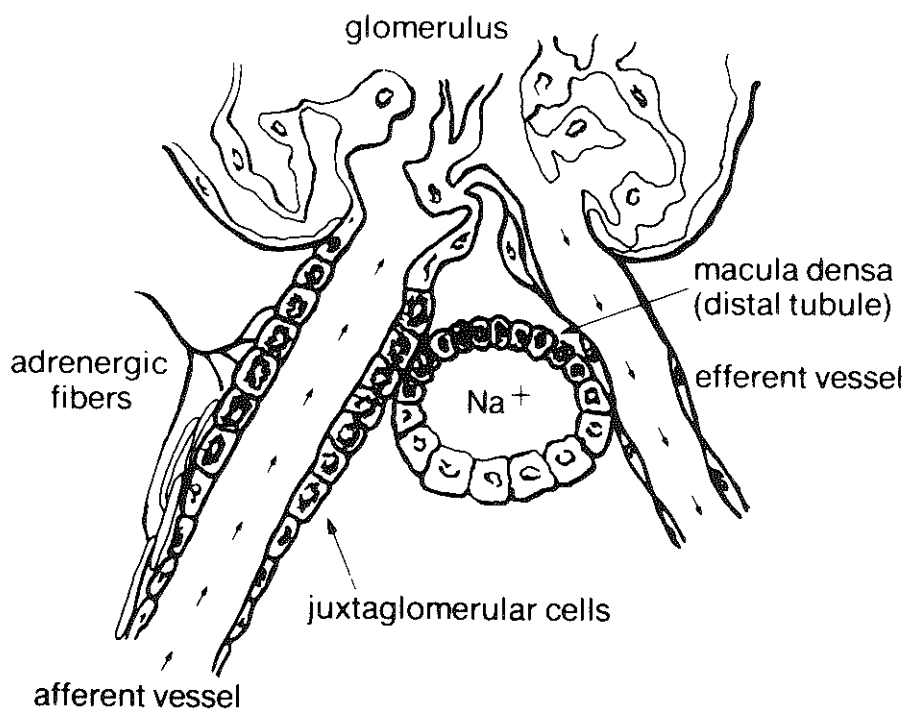


Fig.1. Het juxta-glomerulaire apparaat.

Eveneens toonden Pitcock et al. (1959) aan, dat de granulatie van de juxtaglomerulaire cellen toenam evenals het renine-gehalte in de nieren van ratten met een natrium-arm dieet, vergeleken met contrôle-ratten.

- c) Edelman en Hartroft gebruikten een immunofluorescentie-techniek, waarbij antiserum tegen renine, verkregen uit hondeplasma werd gekoppeld aan een fluorescerende kleurstof. Hiermee toonden zij in niercoupes aan dat het fluorescerende antilichaam zich hoofdzakelijk aan de juxtaglomerulaire cellen bond (Edelman en Hartroft, 1961).

### 3. Factoren die de reninesecretie beïnvloeden

Een korte beschrijving van de relevante nieranatomie is essentieel voor het begrip van de mogelijke contrôle-mechanismen. Het is algemeen geaccepteerd dat renine wordt geproduceerd in een gespecialiseerd deel van het nephron, bekend als het juxtaglomerulaire apparaat (Fig.1).

Hierin onderscheiden wij de granulaire juxtaglomerulaire cellen, die waarschijnlijk gedifferentieerde gladde spiercellen zijn (Goormaghtigh, 1939) en die door de meeste onderzoekers worden beschouwd als de plaats van renine-productie, -opslag en -secretie. Hoewel uit verschillende organen zoals uterus, placenta, hersenen en speekselklieren renine-achtige enzymen zijn geëxtraheerd, zouden wij de naam renine willen beperken tot het enzym, verkregen uit de nier (Anderson et al., 1968; Ganten et al., 1971; Cohen et al., 1972).

De juxtaglomerulaire cellen liggen als tevoren beschreven in de media van de afferente arteriole direct aangrenzend aan de glomerulus.

De macula densa is een gespecialiseerd deel van de ascenderende tubulus, die weer in contact komt met de vasculaire pool van de glomerulus waaruit hij ontspringt. De cellen

liggen in nauw anatomisch contact met de juxtaglomerulaire cellen. Deze epitheelcellen van de tubulus vormen een concentratie van kernen waaraan deze formatie zijn naam ontleent.

McManus toonde in 1944 aan, dat het Golgi-apparaat van de macula densa cel ongewoon was, in die zin, dat het gelocaliseerd was aan de basis in plaats van aan de zijde van het lumen; hij veronderstelde dat één of andere substantie van de macula densa cel naar de juxtaglomerulaire cel zou gaan.

De nier wordt voornamelijk geïnnerveerd door sympathische zenuwen. Zenuwvezels worden in nauw contact aangetoond met de vasculaire en tubulaire component van het juxtaglomerulaire apparaat (Barajas, 1964; Müller en Barajas, 1972).

### 3a. De baroreceptor theorie

Tobian (1960) veronderstelde dat de juxtaglomerulaire cellen gezien hun localisatie in de wand van de afferente arteriole gevoelig zouden zijn voor rekking. Een toegenomen bloeddruk zou de rekking doen toenemen en daarmee de reninesecretie remmen.

Een verminderde bloeddruk zou de rekking doen afnemen en de reninesecretie bevorderen.

Kolff (1958) zag dat de hoeveelheid renale pressorsubstantie toenam bij vermindering van de nierperfusiedruk. Er werd geen verschil waargenomen tussen een pulserende en niet-pulserende doorstroming. Kolff transplanteerde bij zijn experimenten donornieren naar de nek, waarbij de a.carotis werd verbonden met dat gedeelte van de aorta dat boven het niveau van de aa.renales ligt en waarbij de v.jugularis werd verbonden met de v.cava inferior. Het vrije deel van de v.cava inferior werd afgebonden. Het distale vrije deel van de aorta werd verbonden met een "depulsatie kamer", in

principe een ballon, welke door inkrimpen en uitzetten de pulsaties kan reduceren zonder de druk te veranderen.

Skinner et al. (1963, 1964) bepaalden de veneuze en arteriële pressoractiviteit bij verschillende graden van aortaconstrictie. Een reninesecretie werd niet gevonden bij afname van de polsdruk, wel bij een vermindering van de gemiddelde arteriële bloeddruk. Bij toenemende graad van aortaconstrictie boven de aa.renales werd eerst een vermindering van de polsdruk in de nierarteriën waargenomen. Het was mogelijk een vermindering van 50% van de polsdruk te bewerkstelligen zonder de gemiddelde arteriële bloeddruk te beïnvloeden. Bij verdere graad van constrictie vond ook een verlaging plaats van de gemiddelde arteriële bloeddruk, waarna reninesecretie plaats vond.

Ook de waarnemingen van Davis (1964) pleiten ertegen dat veranderingen in polsdruk een stimulus zouden zijn. Davis vermeldt een toeneming van het renine-gehalte in nier-venebloed en in perifeer veneus bloed, wanneer tegelijkertijd de arteriële polsdruk wordt verhoogd en de gemiddelde arteriële bloeddruk wordt verlaagd bij experimenten met honden welke een high output heart failure kregen ten gevolge van een experimentele aortale-cavale fistel. Het ziet er gezien voornoemde experimenten naar uit, dat het intrarenale receptor-mechanisme wel reageert op veranderingen in gemiddelde arteriële bloeddruk, maar niet op veranderingen in arteriële polsdruk. Deze stimulus is volgens Vander (1967) te beïnvloeden door:

A) arteriële bloeddruk

Veranderingen in de arteriële druk zullen er toe leiden parallelle veranderingen teweeg te brengen in de intravasculaire druk van de afferente arteriole, de transmurale druk en de wandspanning. Dit is echter niet noodzakelijk, omdat veranderingen in de arteriële druk

kunnen worden gedempt of versterkt ter hoogte van de granulaire cellen door actieve verandering in de vaattonus.

B) actieve afferente arteriolaire vaattonus

De druk ter hoogte van de granulaire cellen wordt beïnvloed door de activiteit van de afferente arteriolaire gladde spieren. Wanneer bijvoorbeeld een toegenomen reninesecretie niet wordt vergezeld door een verminderde arteriële druk (bijvoorbeeld bij zoutonthouding), pleit dit niet tegen de baroreceptortheorie omdat het de mogelijke verandering in de arteriolaire tonus negeert. Een toegenomen afferente arteriolaire constrictie kan eenzelfde effect op de rekking hebben als een verminderde arteriële druk (Lowe, 1964).

C) renale interstitiële druk

Ofschoon de renale interstitiële druk meestal constant is en zodoende de transmurale drukgradient direct zal variëren met de intravasculaire druk, kunnen veranderingen in interstitiële drukgradient deze druk beïnvloeden. Vooral onder experimentele omstandigheden, die worden geschapen om de renine-release te bestuderen (osmotische diurese, niervene-afsluiting, ureter-afsluiting) kan deze druk veranderen.

Meer aanwijzingen voor een renale vasculaire controle op de reninesecretie komen onder andere van Blaine en Kaloyanides. Blaine et al. (1971) toonden met behulp van het geïsoleerd non-filtering kidney model, waarbij tevens denervatie en adrenalectomie had plaats gevonden aan, dat bij verbloeden en suprarenale aortaconstrictie een verhoogde reninesecretie plaats vond.

Kaloyanides et al. (1973) toonden bij een geïsoleerd niermodel waarbij de ureter werd afgeklemd aan, dat een verlaagde druk in de nierarterie leidde tot een verhoogde reninesecretie en een verhoogde druk tot een verlaagde reninesecretie.

### 3b. De macula densa theorie

De anatomie van het juxtaglomerulaire apparaat is erg suggestief voor een functionele relatie tussen de macula densa en de juxtaglomerulaire cellen.

De rol van de macula densa is echter nog niet geheel duidelijk. Lijnrecht tegenover elkaar staan de theorie- en van Vander & Miller en Thureau.

Vander en Miller (1964) menen dat een verminderde natrium concentratie in de tubulus ter hoogte van de macula densa leidt tot een verhoogde reninesecretie; daarentegen zou een verhoogde natrium concentratie ter plaatse leiden tot een remming van de reninesecretie.

Zij komen tot deze uitspraak door hun acute proeven met honden, waarbij de rechter nier veneus werd gecatheteriseerd voor het nemen van bloedmonsters, de ureter werd gecatheteriseerd, verder werd de druk gemeten in de a. carotis en de a.femoralis.

De resultaten van dit onderzoek zijn als volgt:

#### Protocol 1.

Alléén constrictie van de aorta proximaal van de rechter a.renalis gaf verlaging van de gemiddelde nierarteriedruk en verhoging van de druk proximaal van de constrictie. Er vond een daling plaats van de glomerulusfiltratie, de renal plasma flow en natrium- en waterexcretie. De reninesecretie steeg. Alleen voor de natriumexcretie bestond een significante correlatie met de renale veneuze pressor-activiteit.

#### Protocol 2.

Toedienen van diuretica na aortaconstrictie.

- a) osmotische diuretica (ureum, mannitol, natriumsulfaat)
- b) chlorothiazide, acetazolamide.

De diuretica veroorzaakten een daling van de toegenomen reninesecretie en toegenomen proximale bloeddruk tot de uitgangswaarden. De water- en natriumexcretie was toegenomen. De osmotische diuretica veroorzaakten geen ver-

andering in nierhaemodynamica. Chlorothiazide en acetazolamide gaven een verdere vermindering van glomerulusfiltratie en renal plasma flow.

#### Protocol 3.

Diuretica gevolgd door constrictie van de aorta.

De diuretica voorkwamen de toename in reninesecretie na constrictie van de aorta en de toename in proximale bloeddruk. Zij voorkwamen niet de veranderingen in nierhaemodynamica ten gevolge van de constrictie zoals gezien bij protocol 1.

#### Protocol 4.

Ureter occlusie.

Ureter occlusie veroorzaakte in alle dieren een toegenomen bloeddruk en reninesecretie. De nierhaemodynamica werden niet nagegaan.

Thureau en Schnermann (1965) veronderstelden dat een verhoogde natriumconcentratie ter hoogte van de macula densa een verhoogde reninesecretie veroorzaakte.

Bij hun experimenten met behulp van nierpuncties vinden zij, dat een toenemende natriumconcentratie ter hoogte van de macula densa snel tot een collaps van het proximale gedeelte van de tubulus leidt.

Dit werd toegeschreven aan een verminderde glomerulusfiltratie, die werd veroorzaakt door een toegenomen reninesecretie, vervolgens generatie van angiotensine en resulterende in een vasoconstrictie van de afferente arteriole.

Mannitol-injecties gaven geen collaps, zodat de osmolaire concentratie op zich niet de primaire oorzaak was.

De reactie was zeer gering of afwezig bij nieren die weinig renine bevatten.

Eveneens wijzen de experimenten van Cooke et al. (1970) op een rol van de natriumconcentratie in de tubulus als een stimulus op de regulatie van de reninesecretie. Etacrynezuur, een remmer van de natriumreabsorptie in het ascenderende deel van de lus van Henle, veroorzaakt een verhoogde reninesecretie binnen vijf minuten na intraveneuze toediening, terwijl volumedepletie werd voorkomen door re-infusie van urine in de v.femoralis. Wanneer tijdens een periode van een afgesloten ureter (hetgeen op zich een verhoogde reninesecretie veroorzaakte) etacrynezuur werd toegediend, vond geen reactieve stijging van de reninesecretie plaats. Na opheffen van de afsluiting vond een stijging van de reninesecretie plaats binnen vijf minuten. Contrôle-waarnemingen, waarbij geen etacrynezuur werd toegediend, lieten een snelle daling zien in de reninesecretie na opheffen van de afsluiting. Chlorothiazide, wat werkt op de distale nephron en weinig op de lus van Henle en daardoor minder effect proximaal van de gepostuleerde sensor in de macula densa heeft, liet geen verhoogde reninesecretie zien bij re-infusie van de urine. Deze studie laat een direct effect zien van etacrynezuur op de reninesecretie welke onafhankelijk is van volumedepletie, maar afhankelijk is van een tubulaire urine flow. Ook het werk van Cooke geeft geen duidelijke uitspraak over wat de eigenlijke stimulus voor de reninesecretie is. Hoewel de natriumconcentratie in de tubulus toeneemt is het specifieke effect van het etacrynezuur op de natriumreabsorptie ter hoogte van het macula densa segment niet bekend. Men kan als argument aanhalen dat etacrynezuur de reninesecretie kan doen toenemen door remming van de natriumreabsorptie door de macula densa cellen ondanks een toegenomen natriumconcentratie in de tubulusvloeistof. Als gevolg hiervan kan de natriumconcentratie in de macula densa cel zijn toegenomen of afgenomen, afhankelijk van de



plaats waar het pharmacon zijn werk uitoefent, aan de antiluminale of luminale zijde van de cel.

### 3c. Het sympathische zenuwstelsel

Zoals tevoren beschreven (blz.19) zijn zenuwvezels in nauw contact met het juxtaglomerulaire apparaat aantoonbaar.

Taquini et al. (1964) toonden aan dat een gedenerveerde rattenier minder renine bevatte dan de niet-gedenerveerde nier.

Dynamische studies, uitgevoerd door Vander (1965) en Coote et al. (1972) wijzen duidelijk op de invloed van sympathische stimuli op de reninesecretie.

Vander toonde bij honden aan dat bij intraveneuze infusie van epinephrine of norepinephrine, waarbij de druk in de a.renalis constant werd gehouden door suprarenale contractie van de aorta, de reninesecretie toenam.

Hetzelfde resultaat verkreeg hij door elektrische stimulatie van de renale arteriële zenuwplexus. In beide gevallen namen de renal plasma flow en glomerulusfiltratie af.

Coote toonde aan, dat stimulatie van de renale zenuwen bij katten direct leidde tot een daling in de nierdoorbloeding, welke ondanks verdere stimulatie geleidelijk weer steeg naar de uitgangswaarde.

Een index voor de niervaatweerstand werd verkregen door het quotiënt van de bloeddruk (a.carotis) en nierdoorbloeding. De bloeddruk toonde geen verandering, zodat de benaderde niervaatweerstand een spiegelbeeld liet zien van de nierdoorbloeding.

Een maximum effect werd verkregen bij ongeveer 15 pulsen per sec. en 15 V. Hoger voltage en kortere of langere pulsduur gaven geen groter effect.

De reninesecretie steeg in alle gevallen, maar nam weer af tot de uitgangswaarde, onafhankelijk van het feit of de stimulatie werd gehandhaafd.

De graad van respons van de reninesecretie liet een aanzienlijke individuele variatie zien.

Blokkade met de  $\alpha$ -antagonist phentolamine leidde tot een daling in de nierperfusiedruk, hetgeen gedeeltelijk werd teniet gedaan door constrictie van de aorta onder de a.renalis. Tijdens zenuwstimulatie vond nu geen reductie plaats van nierdoorbloeding of een stijging van de reninesecretie.

De verminderde nierdoorbloeding die werd gezien tijdens zenuwstimulatie werd geïmiteerd door constrictie van de a.renalis. Hierop vond een stijging plaats van de reninesecretie. Ook na blokkade met phentolamine trad na constrictie een verhoging op van de reninesecretie.

Eveneens werd het effect van de  $\beta$ -antagonist propranolol nagegaan. Ook hier werd de bloeddruk daling die optrad gedeeltelijk tegengegaan door constrictie van de aorta onder het niveau van de a.renalis.

In geen van deze experimenten waren er aanwijzingen dat propranolol enig effect zou hebben op de graad van reductie van de doorstroming na zenuwstimulatie of op het tijdsinterval van de terugkeer naar de oorspronkelijke doorstroming.

Er vond echter geen stijging plaats van de reninesecretie. De auteurs veronderstellen dat het effect van de zenuwstimulatie op de reninesecretie wordt veroorzaakt door veranderingen in nierdoorbloeding, en dat er bovendien een stap aanwezig is die leidt tot reninesecretie die gevoelig is voor propranolol. Deze stap moet distaal liggen van het effect op de vasculaire gladde spier.

Indirect bewijs voor een belangrijke rol van het sympathische zenuwstelsel op de reninesecretie leverden Gordon et al. (1967). Bij normale proefpersonen steeg de plasma renine activiteit na infusie van catecholamines (norepinephrine : epinephrine 10 : 1; met als criterium een systolische bloeddrukstijging van 25 mmHg boven de contrôle-waarde), zoutdepletie en opstaan. Bovendien steeg zowel bij zoutdepletie als bij opstaan de catecholamine-uitscheiding in de urine.

Een patiënt met een ernstige insufficiëntie van het autonome zenuwstelsel toonde geen verhoogde plasma renine activiteit of verhoogde urine-uitscheiding van catecholamines ondanks een daling in de bloeddruk. Wanneer bij deze patiënt de orthostatistische hypotensie werd voorkomen met catecholamine-infusie, trad er wel een toename op van plasma renine activiteit.

De auteurs concluderen dat bovenstaande bevindingen bewijzen dat de toename van sympathische activiteit en niet de drukverandering de verhoogde reninesecretie veroorzaakt.

Dat de stimulatie van de reninesecretie door het centraal zenuwstelsel via de nierzenuwen verloopt, moge blijken uit het feit dat elektrische stimulatie van pressor area in het mesencephalon of medulla bij de hond de reninesecretie deed stijgen.

Deze renine respons werd teniet gedaan door renale denervatie (Ueda, 1967; Passo et al., 1971).

Onderzoek bij geïsoleerde nierschorscellen toonde aan dat incubatie met adrenaline en noradrenaline de reninesecretie en -productie deden toenemen (Michelakis et al., 1969; Johns et al., 1975).

Bovenstaand overzicht van experimenten geeft een aanwijzing op welke wijze het sympathisch zenuwstelsel en de catecholamines de reninesecretie kunnen beïnvloeden:

- 1) direct effect op de juxtaglomerulaire cellen.
- 2) beïnvloeding van de effecten welke in relatie staan met de vaatreactie, onder te verdelen in:
  - a) het effect op de gepostuleerde baroreceptor
  - b) beïnvloeden van de gepostuleerde macula densa receptor door beïnvloeding van de glomerulaire filtratie tengevolge van de afferente arteriële constrictie.

### 3d. Humorale beheersing van de reninesecretie

#### Electrolyten:

Het effect van natrium en kalium op de reninesecretie lijkt voornamelijk tubulair bepaald, aangezien hypertone zoutinfusie in de hondenierarterie leidt tot reninesecretie-remming, zonder meetbare verandering in haemodynamiek (Nash, 1968; Shade, 1972).

Daarentegen heeft hypertone zoutinfusie geen effect op de reninesecretie van de non-filtering kidney (Shade, 1972). Evenzo heeft kalium een remmend effect op de reninesecretie in de normale hondenier, maar niet in de non-filtering kidney (Shade, 1972).

Kalium-deprivatie veroorzaakt daarentegen een toegenomen renineconcentratie in plasma (Brunner, 1970).

Reeds eerder werd het stimulerend effect van natrium-deprivatie op de reninesecretie vermeld, ofschoon hierbij onder andere een vermindering van plasmavolume en perifere druk een rol kunnen spelen.

#### Het antidiuretisch hormoon:

Een remmend effect van het antidiuretisch hormoon op de reninesecretie blijkt uit de volgende waarnemingen:

Het antidiuretisch hormoon remt de reninesecretie veroor-

zaakt door isoprenaline in de geïsoleerd geperfundeerde rattenier. Hierbij vond een verhoging plaats van de perfusiedruk. Het weglaten van calcium uit het perfusie-medium voorkwam de drukstijging; er bleef echter een remmend effect op de door isoprenaline gestimuleerde reninesecretie (Vandongen, 1975). Het remmend effect werd ook waargenomen in de non-filtering kidney, zonder dat er een meetbare invloed was op de druk of nierdoorbloeding (Shade et al., 1973).

Ook bij mensen kon de reninesecretie worden geremd door infusie met het antidiuretisch hormoon (Hesse en Nielsen, 1977). Er was hierbij geen correlatie aantoonbaar met veranderingen in bloeddruk, hartfrequentie of bloedvolume. De auteurs veronderstellen dan ook een intrarenaal aangrijpingspunt van het antidiuretisch hormoon.

#### Het angiotensine II:

Shade (1973) kon met het non-filtering kidney model het remmend effect van angiotensine II op de reninesecretie aantonen.

De bevindingen van Vandongen en Peart (1974) met behulp van de geïsoleerde rattenier waren eensluidend.

Niercelsuspensies geïncubeerd met angiotensine II toonden een geremde renineproductie en -release (Michelakis, 1971).

#### Catecholamines:

De rol van de circulerende catecholamines is niet met zekerheid vastgesteld.

Wel is de reninesecretie te beïnvloeden door incubatie van niercelsuspensies en niercoupes met catecholamines, infusie van catecholamines in de a.renalis en systemische toediening van alpha- en bèta-agonisten en alpha- en bèta-blokkers. Hierbij vindt men in de literatuur een grote mate van eensgezindheid wat betreft het stimulerend effect van

bèta-agonisten op de reninesecretie.

Het effect van alpha-agonisten lijkt gezien de literatuur variabel.

In hoofdstuk II zal hierop uitgebreider worden ingegaan.

## Hoofdstuk II

### Verantwoording van het onderzoek

De rol van de alpha-receptoren bij de regulatie van de reninesecretie.

- 1) Experimenten welke een stimulerend effect doen veronderstellen.
- 2) Experimenten welke een remmend effect doen veronderstellen.
- 3) Experimenten welke het ontbreken van een bepaalde invloed doen veronderstellen.
- 4) Doelstelling van het onderzoek.

## Hoofdstuk II

### Verantwoording van het onderzoek

Het leidt geen twijfel dat bèta-adrenerge stimuli een stimulerende werking hebben op de reninesecretie. Zeer waarschijnlijk is dit een rechtstreekse invloed op de juxtaglomerulaire cel.

Experimenten met het totale individu (Winer et al., 1969; Michelakis en Mc.Allister, 1972; Weber et al., 1974; Leenen et al., 1975), eenzijdig genefrectomeerde proefdieren (Tanigawa et al., 1972; Assaykeen et al., 1974; Johnson et al., 1976), geïsoleerde nieren (Vandongen et al., 1973; Vandongen en Peart, 1974a; Vandongen, 1975a), niercoupes (Capponi en Vallotton, 1976; Weinberger et al., 1975) en niercelsuspensies (Michelakis et al., 1969; Johns et al., 1975) resulteren alle in een verhoogde reninesecretie onder invloed van bèta-adrenerge stimuli.

Carrière (1969) kon met behulp van de Krypton<sup>85</sup> washout techniek geen veranderingen waarnemen in de nierdoorbloeding na infusie van de bèta-agonist isoproterenol in de a.renalis. Deze waarneming pleit ook voor een aangrijpingspunt voorbij de vaatreceptor, dat wil zeggen direct op de juxtaglomerulaire cel.

Over de invloed van alpha-adrenerge stimuli op de reninesecretie bestaat in de literatuur geen overeenstemming. De resultaten van de verschillende onderzoekers omvatten het gehele scala van stimulerende, ontbrekende en remmende invloeden.

#### 1. Experimenten die een stimulerend effect doen veronderstellen

Winer et al. (1969) vonden bij gezonde vrijwilligers een



stijging van de reninesecretie door kliepen en het toedienen van diazoxide, etacrynezuur en theophylline. Deze stimulering van de reninesecretie werd zowel teniet gedaan door infusie van propranolol als door infusie van de alpha-blokker phentolamine. Gezien de verschillende aard van de toegediende stimuli veronderstelt Winer dat vele, zo niet alle, stimuli die een verhoogde reninesecretie veroorzaken, lopen via een common pathway, waarbij zowel alpha- als bèta-adrenerge receptoren een rol spelen.

Leenen et al. (1975) infundeerden gezonde vrijwilligers met de bèta-agonist isoproterenol en de alpha-agonist methoxamine. Zoals verwacht trad een tegengestelde cardiovasculaire reactie op. Na isoproterenol-toediening daalde de diastolische bloeddruk en steeg de hartfrequentie, daarentegen steeg de diastolische bloeddruk na toedienen van methoxamine en daalde de hartfrequentie. In beide gevallen nam de plasma renine activiteit toe. Deze toename in plasma renine activiteit kon in beide gevallen teniet worden gedaan door propranolol, terwijl propranolol uitsluitend effect had op de cardiovasculaire effecten van isoproterenol.

Leenen concludeert dat alpha- en bèta-agonisten de reninesecretie stimuleren. Hij veronderstelt dat de reninesecretie wordt bemiddeld door een non-specifieke receptor of dat er sprake is van een twee stappen proces, waarbij in het laatste geval ergens na de alpha-adrenerge stimulatie een bèta-receptor in het proces betrokken wordt.

Fray (1976) maakte gebruik van de geïsoleerde rattenier, geperfundeerd met een bloedvrij medium.

Infusie van phenylephrine of methoxamine gaf een renale vasoconstrictie. Hierbij werd de stroomsnelheid verminderd, zodat de gemiddelde perfusiedruk (110 mmHg) constant bleef. Onder deze omstandigheden, waarbij de nierdoorstroming duidelijk lager was dan bij de controle-experimenten, vond

Fray een verhoogde renine activiteit in de perfusie-vloeistof. Deze verhoogde renine activiteit werd niet gezien en was zelfs lager dan bij de contrôle-waarnemingen wanneer de vaatverwijder papaverine werd toegevoegd aan het phenylephrine. De gemiddelde druk werd op 110 mmHg gehouden. Wanneer men tijdens toedienen van phenylephrine de gemiddelde druk liet oplopen tot 200 mmHg, werd een renine activiteit gevonden die niet verschilde van de experimenten met phenylephrine + papaverine. De nierdoorstroming tijdens de contrôle-experimenten, de experimenten met phenylephrine + papaverine en de experimenten met phenylephrine en verhoogde druk lag in dezelfde orde van grootte.

## 2. Experimenten die een remmend effect doen veronderstellen

In 1974 vermeldten Vandongen en Peart (1974a), gebruik makende van de geïsoleerd geperfundeerde rattenier, dat wanneer noradrenaline, dat behalve alpha- ook een geringe bèta-adrenerge activiteit bezit, werd geïnfundeerd in een vaso-actieve dosering, er geen verandering plaats vond in reninesecretie ten opzichte van contrôle-waarnemingen. Wanneer noradrenaline werd geïnfundeerd tesamen met de alpha-blokker phenoxybenzamine vond er een duidelijke stijging plaats van de reninesecretie, terwijl een stijging in perfusiedruk uitbleef.

Deze stijging in reninesecretie kon duidelijk worden verminderd door infusie van de bèta-antagonist propranolol. Vandongen en Greenwood (1975b) vinden met hetzelfde geïsoleerd geperfundeerde rattenier-model dat noradrenaline geïnfundeerd in een lage, niet-vaso-actieve dosering de reninesecretie doet toenemen. Infusie van phenoxybenzamine voorkwam niet de toename in reninesecretie.

De auteurs veronderstellen dat bij deze niet vasoconstrictoire dosis geen alpha-receptor stimulatie heeft plaats gevonden en dat daardoor een grotere gevoeligheid aan de bèta-receptor kan worden toegeschreven, welke verantwoor-

delijk is voor de stimulatie van de reninesecretie. Ratteniercouples geïncubeerd met isoproterenol, norepinephrine en epinephrine (Capponi en Vallotton, 1976) tonen het volgende beeld: isoproterenol stimuleert de reninesecretie, daarentegen hebben epinephrine en norepinephrine een remmende werking op de reninesecretie. Deze remming werd teniet gedaan door phenoxybenzamine en hierbij trad zelfs een stimulering op van de reninesecretie bij incubatie met norepinephrine. Pettinger et al. (1976) zagen na intraperitoneale toediening van clonidine bij ratten een vermindering van de reninesecretie ten opzichte van controle-ratten. Binnen 10 minuten daalde de serum renine activiteit met 85%, na 100 minuten was dit nog 65%. De gemiddelde bloeddruk gemeten in de aorta abdominalis liet een initiële stijging zien, die binnen 40 minuten terugkeerde naar controle-waarden en na 100 minuten een hypotensieve waarde bleek te hebben bereikt. Perifere sympathische blokkade, ganglion blokkade of cholinergische blokkade konden het inhiberende effect van clonidine niet voorkomen, zodat een perifere werking van clonidine op de reninesecretie mag worden aangenomen. Verder bleek dat de alpha-blokkers phentolamine en phenoxybenzamine het remmend effect van clonidine op de reninesecretie teniet konden doen. Hierbij werd het drukverloop nagegaan tijdens het gebruik van phentolamine. Dit pharmacon blokkeerde de initiële drukstijging van clonidine en potentiëerde de latere depressorfase. Phentolamine op zich had al een hypotensief effect en veroorzaakte een toegenomen reninesecretie. Clonidine echter onderdrukte de reninerelease van de met phentolamine voorbehandelde ratten met 80%. Ook werd het effect nagegaan van clonidine op de door ketamine en hydralazine gestimuleerde reninesecretie.

Deze stimulering schrijven de auteurs toe aan activering van het sympathisch zenuwstelsel welk uiteindelijk zal leiden tot activering van bèta-adrenerge receptors.

Ketamine heeft een mild pressor effect, daarentegen heeft hydralazine een hypotensief effect.

Het bleek dat clonidine in beide gevallen in staat was de reninesecretie te doen afnemen.

Ganglionblokkade met chlorisondamine deed het initiële pressor effect van clonidine sterk toenemen, terwijl na 1 uur de bloeddruk was teruggekeerd naar waarden gelijk aan die van een contrôle-groep ratten welke werd behandeld met alleen clonidine.

Zowel in de fase van hoge gemiddelde bloeddruk als na 1 uur was de remming op de reninesecretie gelijk, hetgeen pleit tegen een perifeer pressor effect van clonidine als mechanisme om de reninesecretie te remmen.

Pettinger en medewerkers veronderstellen op grond van hun bevindingen dat de remmende werking van clonidine op de reninesecretie toe te schrijven is aan activatie van een intra-renale alpha-adrenerge receptor.

### 3. Experimenten welke de afwezigheid van een bepaalde invloed doen veronderstellen

Michelakis en Mc.Allister (1972) gingen de respons na van de plasma renine activiteit op kiepen voor en na chronische alpha receptor blokkade met phenoxybenzamine en chronische bèta blokkade met propranolol.

Tijdens bèta blokkade was zowel in liggende als in staande positie een gesupprimeerde renine activiteit waarneembaar. Phenoxybenzamine veroorzaakte geen significante verandering van renine activiteit in liggende en staande positie ten opzichte van de onbehandelde fase. Bij de personen welke phenoxybenzamine kregen was sprake van een orthostatistische bloeddrukdaling; er was geen verandering in liggend gemeten bloeddruk en polsfrequentie.

De auteurs menen gezien hun bevindingen geen invloed te kunnen toeschrijven aan de functie van alpha-receptoren.

Johnson et al. (1976) gebruikten voor hun experimenten eenzijdig genefrectomeerde honden, waarbij phentolamine en phenoxybenzamine intrarenaal werden geïnfundeerd, onder controle van arteriële bloeddruk (a.femoralis), nierdoorbloeding en hartfrequentie.

Phentolamine veroorzaakte een verminderde arteriële druk en toegenomen hartfrequentie. In hogere doseringen nam de nierdoorbloeding af. De reninesecretie snelheid toonde geen verandering ten opzichte van de uitgangswaarde (monsters afgenomen uit de v.renalis).

Als controle op een voldoende alpha blokkade werd het uitblijven van een verandering in de renale bloeddoorstroming na intrarenale injectie van epinephrine (0,1 mgr/kg) gebruikt.

De auteurs gingen tevens het effect na van een dosering phentolamine welke niet de arteriële druk verminderde, maar wel het effect van intrarenaal toegediende epinephrine voorkwam, omdat gesteld kan worden dat een eventueel remmend effect op de reninesecretie teniet kan worden gedaan door de bloeddrukdaling.

Ook bij deze dosering vond echter geen verandering in de reninesecretie plaats.

Phenoxybenzamine, intrarenaal geïnfundeerd, veroorzaakte een verminderde arteriële bloeddruk, maar de nierdoorbloeding en hartfrequentie bleven onveranderd. Evenmin trad er een verandering op in de reninesecretie.

Ook deze auteurs menen dat er geen aanwijzingen te vinden zijn voor het bestaan van een rol van de alpha-adrenerge receptoren in de regulatie van de reninesecretie.

In vitro studies met behulp van ratteniercouples werden uitgevoerd door Weinberger et al. (1975).

Incubatie met isoproterenol, epinephrine en norepinephrine stimuleerde de reninesecretie. Ook methoxamine stimuleerde de reninesecretie.

D.l. propranolol en phentolamine hadden geen significant effect op de reninesecretie vergeleken met de controle-waarnemingen. Phentolamine had geen effect op de door catecholaminen gestimuleerde reninesecretie.

Propranolol remde het effect van de stimulering van de reninesecretie door catecholaminen.

Het stimulerende effect van methoxamine werd niet geremd door phentolamine, maar wel door propranolol.

Verder bleek, dat methoxamine de renine-stimulatie door isoproterenol remde.

Weinberger en medewerkers veronderstellen dat het effect van methoxamine kan worden verklaard doordat het een partiële agonist is voor de bèta receptor, welke de reninesecretie bevordert en door middel van competitieve inhibitie de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie remt. De auteurs zien in deze in vitro studies geen direct alpha-adrenerge effecten.

#### 4. Doelstelling van het onderzoek

Uit de aangehaalde literatuurgegevens blijkt duidelijk dat er een controverse bestaat betreffende het effect van alpha-adrenerge stimuli op de reninesecretie.

Deze controverse is ten dele te wijten aan verschillen in methodiek. Het is duidelijk dat bij experimenten in het intacte individu zich dusdanige algemeen-circulatoire veranderingen kunnen voordoen, dat er geen uitspraak gedaan kan worden over een locale invloed van de betreffende stof op de receptor.

Ook het gebruik van niercouples (Weinberger et al., 1975) laat niet toe te spreken over een direct effect op de

juxtaglomerulaire cel, aangezien in deze preparaten nog steeds vaatreactie mogelijk is met een eventuele beïnvloeding van de rekreceptor.

Fray (1976) die de invloed heeft nagegaan van alpha-agonisten in de geïsoleerd geperfundeerde rattenier, vermindert de nierdoorstroming om de gemiddelde druk gelijk te houden aan die van de controle-experimenten. Hierdoor ontstond een duidelijk verminderde perfusie van deze nieren ten opzichte van de controles, resp.  $12 \pm 1 \text{ ml.min}^{-1}$  vs.  $27 \pm 1 \text{ ml.min}^{-1}$ . De mogelijkheid van hypoperfusie van niercompartimenten tengevolge van deze manipulatie met als gevolg een gestimuleerde reninesecretie, moet hierbij overwogen worden als oorzaak van de verhoogde renine activiteit onder deze omstandigheden.

Er leek derhalve reden genoeg te zijn om een onderzoek naar de invloed van alpha-adrenerge stimuli op de reninesecretie in te stellen.

Aangezien de nier als renine producent bij uitstek te beschouwen is, kozen wij voor het geïsoleerd geperfundeerde niermodel, waarbij nierdoorstroming en nierperfusiedruk als parameters worden geregistreerd.

Het doel van deze opstelling was na te gaan welke invloed een alpha-adrenerge stimulus heeft op de reninesecretie. In tweede linie moest er naar worden gestreefd een onderscheid te maken tussen een directe invloed op de alpha-receptor en een indirecte invloed, bemiddeld door vaatveranderingen.





EIGEN ONDERZOEK

### Hoofdstuk III

#### Proefopstelling en technieken

- 1) Techniek van de perfusie.
- 2) Vitaliteit van het preparaat.
- 3) Behandeling van de monsters.
- 4) Gebruikte pharmaca en samenstelling perfusaat.

### Hoofdstuk III

#### Proefopstelling en technieken

##### 1. Techniek van de perfusie

Mannelijke Wistarratten met een gewicht tussen 300 en 400 gram werden op een regulair dieet gehouden (Hope Farms AM, 6 mm). De dieren dronken leidingwater naar behoefte.

De temperatuur in de proefdierenstal werd gehouden op 20-22°C. Er was licht van  $\pm$  7.30 tot  $\pm$  16.00 uur.

De ratten werden genarcotiseerd door middel van natriumpentobarbital 0,4 micromol/g. intra-peritoneaal en gehepariniseerd door middel van 50-100 E heparine, toegediend via de vena jugularis.

De linker nier en abdominale vaten werden blootgelegd door middel van een mediane abdominale incisie. De vena cava inferior en aorta werden gecanuleerd tot de afgang van respectievelijk de linker vena renalis en arteria renalis. Via de aorta canule werd in een later stadium het perfusaat toegediend en via de canule in de vena cava werd de uitstromende vloeistof verzameld. De zijvaten werden onderbonden.

De linker ureter werd doorgeknipt zodat geen stuwingsdruk kon optreden, het afklemmen van de ureter veroorzaakt immers een verhoogde reninesecretie (Cooke et al., 1970; Kaloyanides et al., 1973).

Vervolgens werd de vena cava inferior boven de linker nier afgebonden. Daarna werd bij stromende perfusievloeistof de aorta boven de linker nier afgebonden, zodat de linker nier geïsoleerd geperfundeerd werd zonder interruptie van de nierdoorstroming.

Er vond geen recirculatie plaats.

Na het onderbinden van de vena cava en aorta werd de rat opgeofferd door een overdosis pentobarbital.

Het perfusaat werd aangeboden met constante snelheid als een pulserende stroom, door middel van een rollerpomp (Watson and Marlow M.H.R.E. 100) uit een reservoir dat een Krebs-Ringer oplossing bevatte met 36 g/l dextran (mol.gew. 70.000, Pharmacia) en geoxygeneerd met 95% O<sub>2</sub> en 5% CO<sub>2</sub> (Vandongen, 1973). Het perfusaat werd gehandhaafd op een temperatuur van 38°C.

De rollers persten de vloeistof door een wijde slang (silicone tube, diameter 5 mm), welke over een schuin afhellend ondervlak werd geleid waardoor de slang niet geheel afgesloten werd tijdens het pompen. Tegendruk kon zodoende enigermate leiden tot het ontstaan van een ontlastende terugstroming.

Alle pharmaca werden in fysiologisch zout opgelost en met een constante snelheid van 0,04 ml/min. door een infuuspomp (Sweden) in de arteriële canule geïnfundeerd.

Bij controle-waarnemingen werd fysiologisch zout geïnfundeerd (0,04 ml/min.).

De perfusiedruk werd geregistreerd door middel van een transducer-versterker (Thomson Telco) en een schrijver (322 Dual channel D.C. amplifier and recorder).

De doorstroming werd gemeten tijdens afname van de monsters in gecalibreerde buizen.

In de periode tussen 5 en 8 minuten na het starten van de perfusie, wanneer de druk en stroomsnelheid op een acceptabel niveau waren, werd een getimed monster afgenomen van de uitstroomvloeistof voor de bepaling van renine. De tijd van monsterring werd aangegeven als tijdstip 0 minuten.

Verdere monsters uit het perfusaat werden op de aangegeven tijden afgenomen, waarbij de druk (mmHg) en doorstroming (ml/min.) werden geregistreerd. De gemiddelde druk werd

berekend als  $(P_{\text{syst}} - P_{\text{diast}}) \frac{1}{3} + P_{\text{diast}}$ .

(McIntosh et al., 1954).

De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde  $\pm$  standaard fout.

De significantie werd getoetst door middel van de "non-paired student T test".

Figuur 2 toont een schematisch overzicht van de proefopstelling.

De gegevens betreffende de nierdoorbloeding bij ratten wisselen.

Sasaki en Wagner (1971) vinden met behulp van de microsphere techniek ( $50 \mu\text{m}$ ) gemiddeld 6 ml/min.

Chen H. Hsu (1975) vindt met microspheres ( $15 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$ ) gemiddeld 10 ml/min.

Kurtz et al. (1976) maken eveneens gebruik van microspheres ( $15 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$ ) en geven een nierdoorbloeding van gemiddeld 8 ml/min. aan.

Bovenstaande experimenten vonden plaats zonder narcose.

Voor de gemiddelde arteriële bloeddruk bij de rat worden de volgende bevindingen gegeven:

Krieger (1964) vindt gemiddelde drukken tussen 118 en 134 mmHg (a.femoralis) (zonder narcose).

Provoost (proefschrift 1976) vindt drukken tussen 116 en 124 mmHg (a.iliaca) (zonder narcose).

Vandongen (1975) vindt in de geïsoleerd geperfundeerde rattenier drukken tussen 75 en 140 mmHg, bij een doorstroming van 7 ml/min.

## 2. Vitaliteit van het preparaat

Na perfusie werden zes nieren histologisch beoordeeld door drs. J.A.J. Spaas, patholoog-anatoom; er werden geen histologische afwijkingen gevonden.

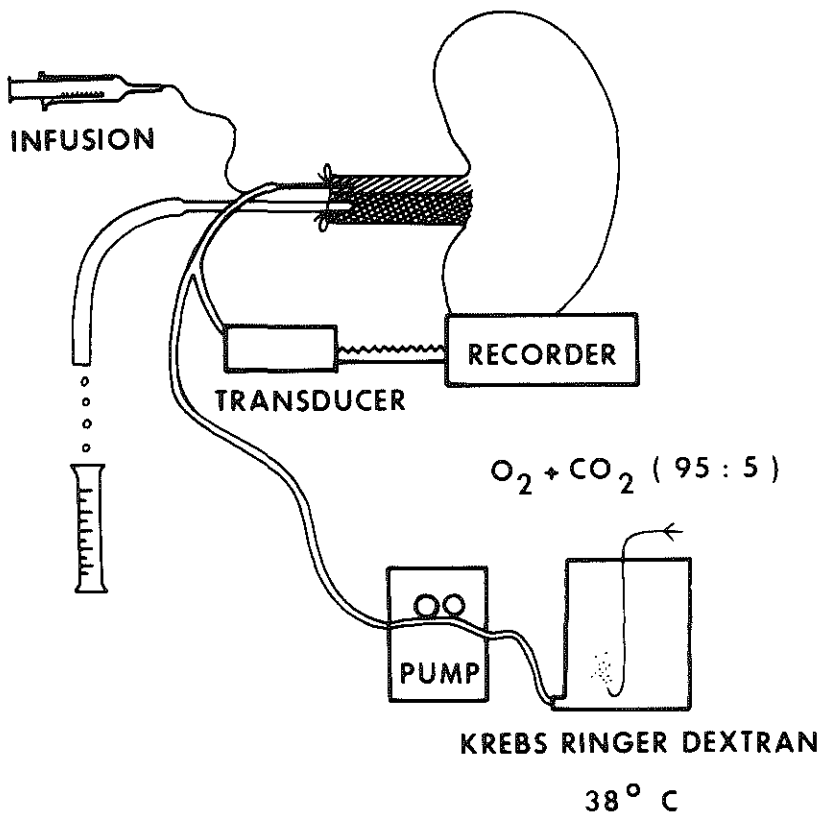


Fig.2. Schematisch overzicht van de proefopstelling.

Tabel I

	<u>Begin perfusie</u>		<u>Eind perfusie</u>	
	instroom-	uitstroom-	instroom-	uitstroom-
	<u>vloeistof</u>	<u>vloeistof</u>	<u>vloeistof</u>	<u>vloeistof</u>
pH	7,50	7,56	7,50	7,50
	7,49	7,44	7,52	7,48
	7,53	7,51	7,50	7,50
Bicarbonaat	± 20	± 21	± 20	± 20
(mmol/l)	± 21	± 19	± 21	± 21
	± 21	± 20	± 22	± 20
PO <sub>2</sub> (mmHg)	223	147	224	129
	223	116	219	116
	218	123	213	119
PCO <sub>2</sub> (mmHg)	27	24	27	25
	28	28	27	29
	26	26	28	26
K (mmol/l)	5,6	5,6	-	5,6
	5,7	5,9	-	5,7
	5,7	5,9	-	5,5
SGOT	n.a.	n.a.	-	n.a.
(E/l Wroblenski)	n.a.	n.a.	-	n.a.
	n.a.	n.a.	-	n.a.
SGPT	n.a.	n.a.	-	n.a.
(E/l Wroblenski)	n.a.	n.a.	-	n.a.
	n.a.	n.a.	-	n.a.
LDH	n.a.	n.a.	-	n.a.
(E/l Wroblenski)	n.a.	n.a.	-	n.a.
	n.a.	n.a.	-	n.a.

n.a. = niet aantoonbaar

Bij drie nieren werden zuurstofextracties nagegaan en kalium-, transaminasen-, LDH- en pH-bepalingen verricht aan het begin en eind (na 14 minuten) van een totale perfusie. De bepalingen (tabel I) werden verricht door het klinisch-chemisch laboratorium van het Zuiderziekenhuis.

Gedurende de perfusieduur bleven vaatrespons en renine-secretie beïnvloedbaar.

Bovenstaande gegevens wijzen op een voortdurende vitaliteit van het preparaat.

### 3. Behandeling van de monsters

Na het afnemen werden de monsters direct ingevroren. De perfusaatmonsters werden successievelijk bij pH 4,5 en pH 7,5 gedialyseerd volgens de methode van Skinner (1967) voor de bepaling van plasma renine activiteit. Vervolgens 3 uur geïncubeerd met plasma van genefrectomeerde ratten als bron voor overmaat aan renine substraat (behandeld als schapesubstraat volgens de methode van Skinner, met dien verstande, dat de ratten 24 uur tevoren werden genefrectomeerd en de pH bij dialyse gebruikt, 4,5 was).

Verdere reactie werd beëindigd door verhitting op 85°C gedurende 5 minuten.

De monsters werden getest op angiotensine I door middel van radio immuno assay (Boyd et al., 1969), waarbij Asp<sup>1</sup>-Ile<sup>5</sup> Angiotensine (Schwarz-Mann) als standaard werd gebruikt. Alle monsters van een experiment werden tegelijk behandeld. Als contrôle werd steeds een monster uit een perfusaatpool meebepaald, welke was verzameld uit de uitstroomvloeistof.

De gemiddelde waarde was 35,0 nmol AI h<sup>-1</sup>l<sup>-1</sup> met een standaard deviatie van 3,1 nmol AI h<sup>-1</sup>l<sup>-1</sup> (n=26) dit levert een variatie coëfficiënt op van ongeveer 9%.



De reninesecretie snelheid werd berekend als het product van nmol Asp<sup>1</sup>-Ile<sup>5</sup>-Angiotensine I gegenereerd per uur per liter perfusaat en de renale perfusie snelheid (ml/min.).

Het verschil tussen totaal renine en actief renine (hoofdstuk VII) werd onderzocht door het verschil in renine gehalte na te gaan, na dialyse van gedeelten van één monster bij respectievelijk pH 3,3 en pH 4,5. In het betreffende hoofdstuk wordt hierop verder ingegaan.

#### 4. Gebruikte pharmaca

1,4 Dihydrazinophthalazinemethaansulfonaat	(CIBA)
Isoprenalinesulfaat	(BROCADES)
Phenylephrinehydrochloride	(BROCADES)
Phenoxybenzaminehydrochloride	(SMITH KLINE AND FRENCH LABORATORIES LTD.)

#### Samenstelling van de gemodificeerde Krebs-Ringer-Dextran oplossing voor de perfusie

4,7 mM KCl
1,1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,1 mM MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
4,9 mM Na pyruvaat
4,9 mM L glutaminezuur
37,3 mM D glucose . H <sub>2</sub> O
24,9 mM NaHCO <sub>3</sub>
2,7 mM CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
94,8 mM NaCl
0,5 mM Dextranpoviet 70

## Hoofdstuk IV

Het effect van alpha-adrenerge stimulatie op de renine-secretie tijdens experimentele omstandigheden, waarbij basale condities werden nagestreefd

- 1) Inleiding.
- 2) Het effect van een non-vaso-actieve dosering phenylephrine.
- 3) Het effect van een vaso-actieve dosering phenylephrine.
- 4) Discussie.
- 5) Samenvatting.

## Hoofdstuk IV

Het effect van alpha-adrenerge stimulatie op de reninesecretie tijdens experimentele omstandigheden, waarbij basale condities werden nagestreefd.

### 1. Inleiding

Gezien de reeds vermelde discrepantie in gegevens betreffende de invloed van alpha-adrenerge stimuli op de reninesecretie werd de invloed nagegaan van de alpha-agonist phenylephrine op de reninesecretie in de geïsoleerde rattenier.

De perfusiedruk en nierdoorstroming werden gemeten en de niervaatweerstand werd berekend als het quotiënt van perfusiedruk en doorstromingssnelheid (uitgedrukt in arbitraire eenheden).

### 2. Het effect van een non-vaso-actieve dosering phenylephrine

Fig. 3 toont het beloop van reninesecretie, nierperfusiedruk, doorstromingssnelheid en niervaatweerstand bij de contrôle-experimenten, waarbij fysiologisch zout werd geïnfundeerd.

Er is een toename van reninesecretie in de tijd, welke ook werd waargenomen door Vandongen in zijn experimenten. De gemiddelde procentuele toename van 0 tot 7 minuten was  $107 \pm 35$ . Er is een aanzienlijke interindividuele variatie in secretie snelheid, waaruit geconcludeerd moet worden, dat men met deze proefopstelling alleen belangrijke veranderingen kan signaleren.

De perfusiedruk nam af met  $15 \pm 4\%$  en de doorstromingssnelheid nam toe met  $2 \pm 2\%$  (d.w.z. bleef overeenkomstig de opstelling nagenoeg ongewijzigd), hetgeen resulteerde in een afname van de niervaatweerstand van  $14 \pm 4\%$  over deze periode.

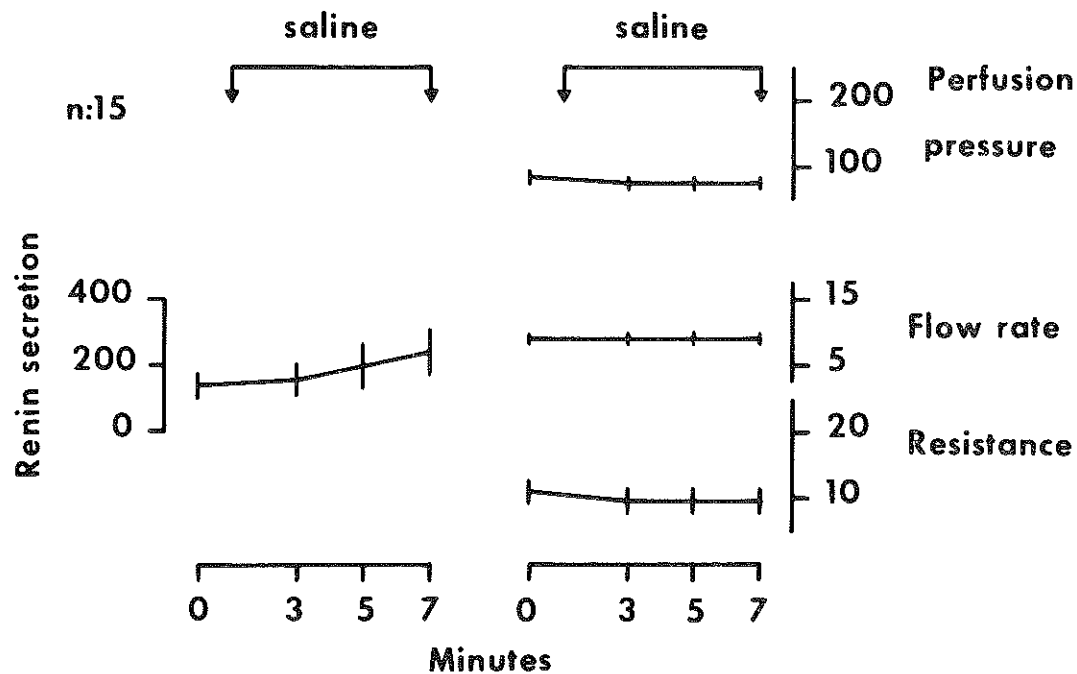


Fig.3. Contrôles-waarnemingen. De infusiesnelheid van fysiologisch zout is gelijk aan de infusiesnelheid van de oplossingen van de pharmaca.

Eenheden voor fig. 3 t/m 15:

Reninesecretie: nmol Angiotensine I.h<sup>-1</sup>l<sup>-1</sup> x ml.min<sup>-1</sup>

Perfusiedruk: mmHg

Doorstromingssnelheid: ml.min<sup>-1</sup>

Weerstand: arbitraire eenheden, als quotiënt van perfusiedruk en doorstromingssnelheid.

Het effect van phenylephrine in verschillende doses op deze functies is weergegeven in de figuren 4-6.

De doses werden zodanig gekozen, dat zowel vasoconstrictoire als niet-vasoconstrictoire doseringen werden gebruikt. Op tijdstip 1 minuut werd phenylephrine in de aangegeven dosering geïnfundeerd.

De procentuele toename in reninesecretie van 0 tot 7 min. met phenylephrine geïnfundeerd in een dosering van 0,05 nmol/min. (fig.4) en 0,5 nmol/min. (fig.5), respectievelijk  $140 \pm 69$  en  $191 \pm 74$  is niet significant verschillend van de controle-waarnemingen ( $p > 0,05$ ).

Eveneens waren de procentuele veranderingen in perfusiedruk ( $-14 \pm 7$  en  $-13 \pm 5$ ), doorstromingssnelheid ( $-0,7 \pm 5$  en  $5 \pm 5$ ) en niervaatweerstand ( $-15 \pm 13$  en  $-15 \pm 7$ ) niet significant verschillend ( $p > 0,05$ ).

### 3. Het effect van een vaso-actieve dosering phenylephrine

Infusie van phenylephrine in een dosering van 5 nmol/min. resulteerde in een duidelijke stijging in nierperfusiedruk ( $50 \pm 18\%$  na 7 min., fig.6), hetgeen duidelijk verschillend is ten opzichte van de lagere doses en de controles ( $p < 0,001$ ).

Aangezien de doorstromingssnelheid bijna constant bleef, nam de niervaatweerstand toe met  $58 \pm 19\%$  na 7 min. ( $p < 0,001$ ). Ofschoon de uitgangswaarde van de reninesecretie hoger was, bleek bij de aanzienlijke interindividuele variatie de toename in secretiesnelheid na 7 minuten ( $86\% \pm 47$ ) niet significant verschillend van de controle-waarnemingen ( $p > 0,05$ ).

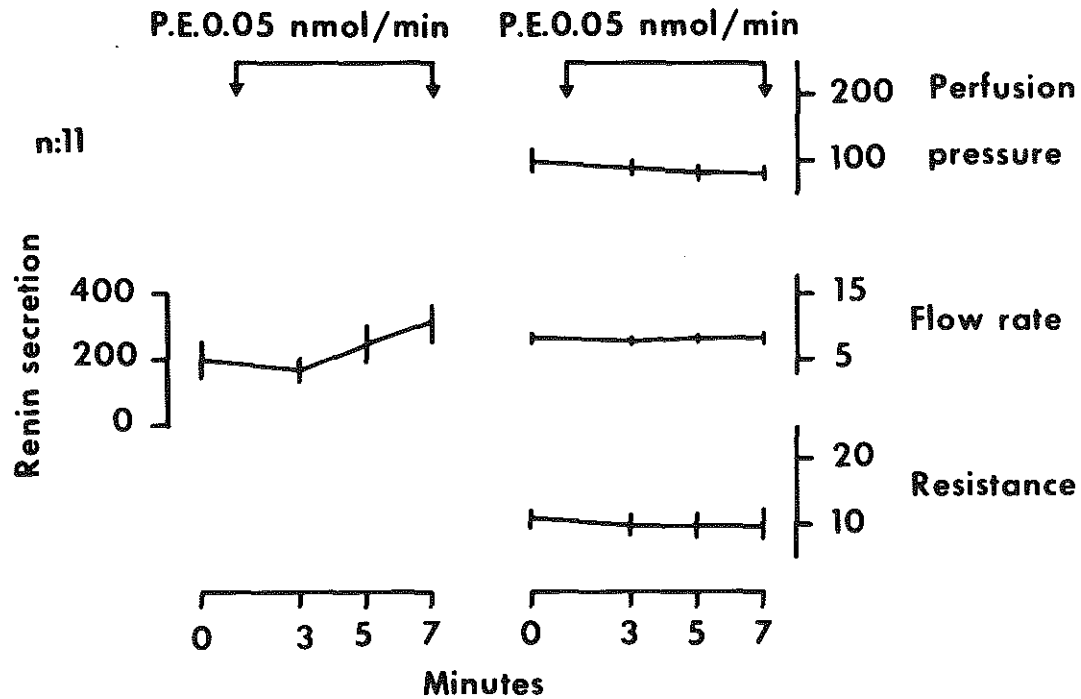


Fig.4. Het effect van een niet-vaso-actieve dosering phenylephrine.  
(P.E. = phenylephrine).

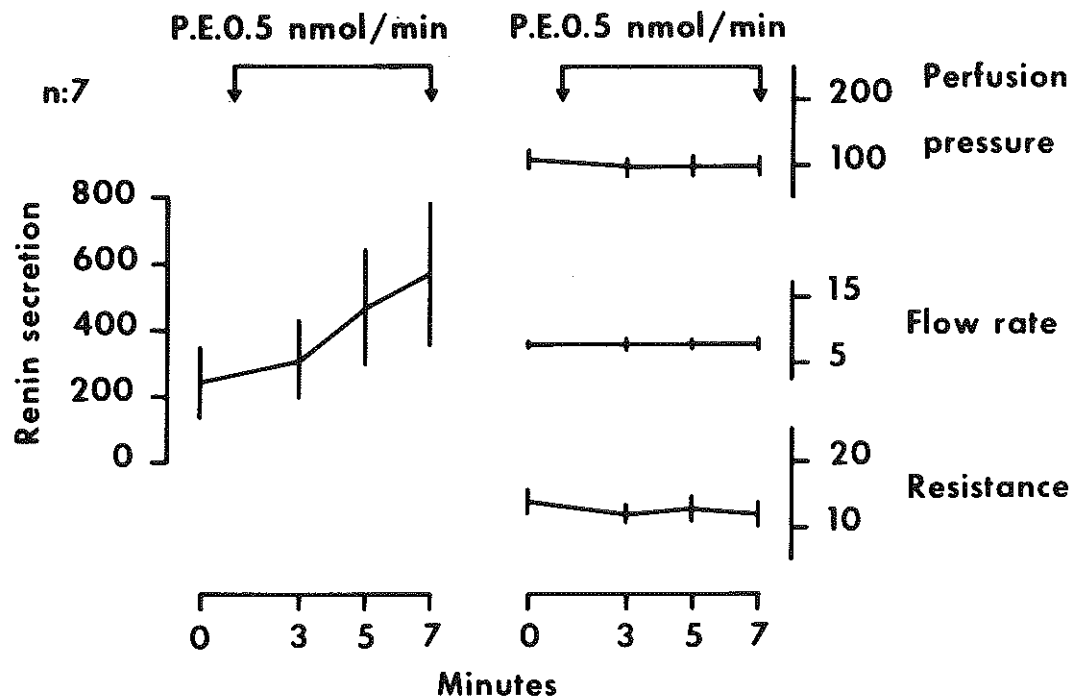


Fig.5. Het effect van een niet-vaso-actieve dosering phenylephrine.

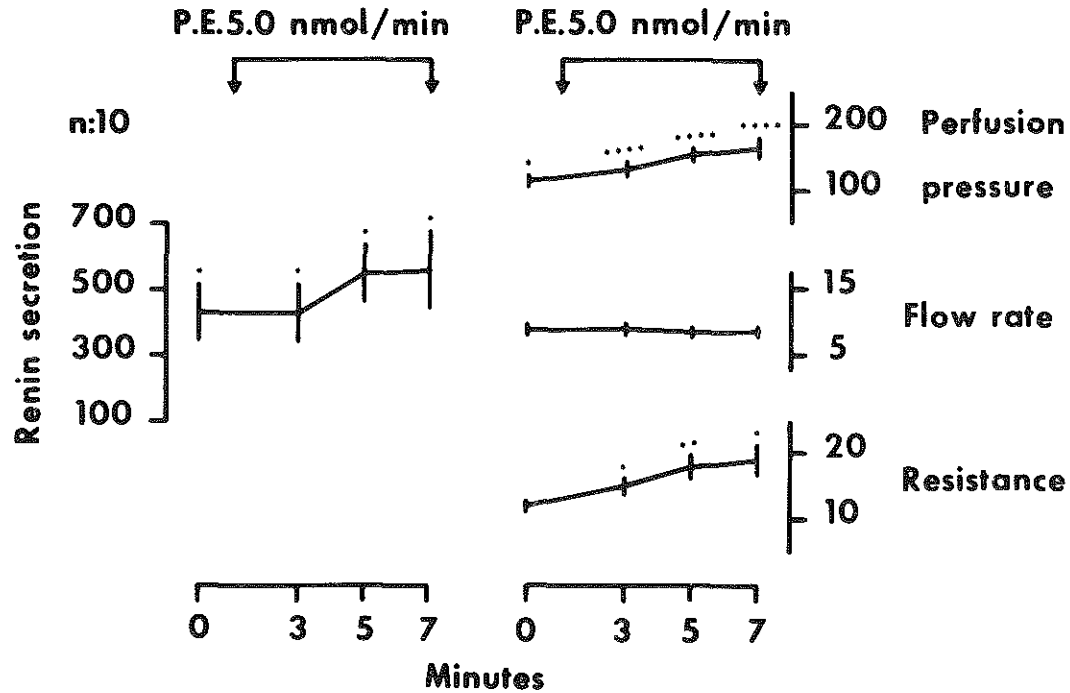


Fig.6. Het effect van een vaso-actieve dosering phenylephrine.  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ .



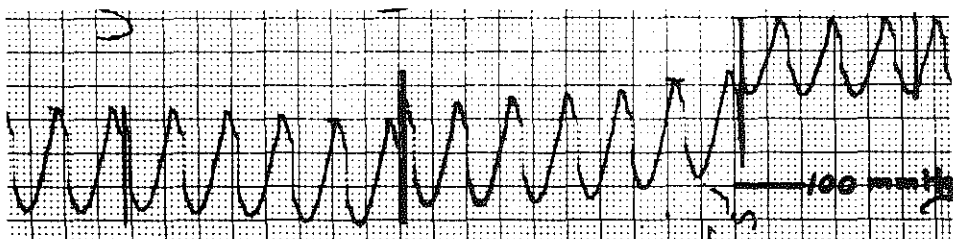


Fig.7. Voorbeeld van een drukregistratie na toedienen van een vaso-actieve dosering phenylephrine.

Verticale as: 1 mm komt overeen met 4 mmHg

Horizontale as: 40 pulsen per minuut.

#### 4. Discussie

De resultaten geven aan dat aan phenylephrine geen renine-stimulerende activiteit die duidelijk kan worden onderscheiden van de contrôle-experimenten, kan worden toegeschreven.

De interindividuele variatie in basale reninesecretie, welke reeds eerder werd waargenomen met dit model (Vandongen en Peart, 1974a) en andere proefopstellingen (Weinberger et al., 1975; Capponi en Vallotton, 1976) kan mogelijk een zwak stimulerend effect maskeren. Zelfs als dit het geval zou zijn, dan nog zou phenylephrine een aanzienlijk zwakkere werking hebben dan isoproterenol. Het is namelijk gebleken, dat de toename in reninesecretie die werd gezien in de contrôle-experimenten duidelijk kan worden onderscheiden van de veel grotere toename die ontstaat bij infusie van de bèta-agonist isoproterenol (0,05 nmol/min.),  $451 \pm 128\%$  (n=4) bij gebruikmaking van hetzelfde model (Vandongen en Peart, 1974a; Vandongen en Greenwood, 1975b).

De verschillen in reactiepatronen na toediening van phenylephrine en isoproterenol ondersteunen de dominerende

betekenis van de bèta-receptor als intermediair bij de adrenerge stimulatie van de reninesecretie.

Voor een belangrijke rol van de alpha-receptor als bemiddelaar bij het stimuleren van de reninesecretie, zoals verondersteld door Winer et al., 1971; Leenen et al., 1975 en Fray, 1976, konden wij geen aanknopingspunten vinden.

Het uitblijven van een effect van phenylephrine op de reninesecretie blijft gehandhaafd wanneer door toediening van een hoge dosis de vasculaire alpha-receptoren worden geactiveerd met als gevolg een aantoonbare vasoconstrictie.

Noradrenaline blijkt de reninesecretie niet te stimuleren, tenzij ofwel de alpha-receptoren worden geblokkeerd met phenoxybenzamine (Vandongen en Peart, 1974a) ofwel lage niet-vasoconstrictoire doses worden gegeven (Vandongen en Greenwood, 1975b). Een dergelijk remmend effect van de alpha-receptor werd ook waargenomen door onderzoekers, die noradrenaline met ratteniercouples incubeerden (Capponi en Vallotton, 1976). Dit geldt eveneens wanneer clonidine aan intacte ratten wordt toegediend (Pettinger et al., 1976). Onze experimenten laten echter geen duidelijk remmende invloed van de alpha-receptoren zien op de reninesecretie in vergelijking met de contrôle-proeven.

Wij concluderen dan ook dat de verkregen resultaten geen steun geven aan de veronderstelling, dat de alpha-adrenerge receptor een rol speelt bij de stimulering van de reninesecretie. Evenmin kon een remmende invloed worden waargenomen.

## 5. Samenvatting

Het effect van de intrarenaal toegediende alpha-receptor agonist phenylephrine op de reninesecretie werd nagegaan in de geïsoleerd geperfundeerde rattenier.

Infusie van phenylephrine in niet-vasoconstrictoire doses

leidde tot een secretie die niet significant verschilde van de contrôle-waarden.

Evenmin kon een verandering in secretie worden waargenomen wanneer phenylephrine werd geïnfundeerd in een dosis die renale vasoconstrictie (althans een toegenomen vaatweerstand) veroorzaakte.

De resultaten ondersteunen derhalve niet de hypothese, waarin een rol wordt toegeschreven aan de alpha-receptor bij de stimulering van de reninesecretie tijdens activatie van het adrenerge systeem.

Evenmin werden aanwijzingen gevonden voor de juistheid van de veronderstelling, dat een stimulatie van de alpha-receptoren tot een onderdrukking van de reninesecretie leidt.

## Hoofdstuk V

### Het alpha-adrenerge effect op de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie

- 1) Inleiding.
- 2) Het effect van phenylephrine op de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie.
- 3) De invloed van phenoxybenzamine op de geremde reninesecretie.
- 4) De invloed van de volgorde van toediening van de pharmaca.
- 5) Discussie.
- 6) Samenvatting.

## Hoofdstuk V

### Het alpha-adrenerge effect op de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie

#### 1. Inleiding

De resultaten verkregen onder omstandigheden waarbij basale condities werden nagestreefd, toonden geen effect aan van een alpha-adrenerge stimulus op de reninesecretie (hoofdstuk IV).

Bij intacte individuen (Winer, 1969; Pettinger, 1976), zag men een duidelijk effect van alpha- en bètablokkade en alpha- en bètastimulatie. Dit kan er op wijzen, dat veranderingen in reninesecretie alleen optreden wanneer een bestaand evenwicht tussen alpha- en bètastimulering wordt verstoord.

Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat onder normale omstandigheden een sympathische tonus met een gelijktijdige stimulatie van alpha- en bètareceptoren aanwezig zal zijn (Zehr en Feigl, 1973).

Deze gedachtengang is te extrapoleren naar de resultaten van Vandongen en Peart (1974a) bij het geïsoleerde niermodel en van Capponi en Vallotton (1976) bij het onderzoek van niercouples. Uit deze onderzoeken is namelijk gebleken, dat duidelijke veranderingen in reninesecretie gaan optreden, wanneer na de inwerking van epinephrine en norepinephrine alphablokkers worden toegepast. In verband hiermee werd het onderstaande onderzoek er op gericht het effect van een alpha-adrenerge stimulus na te gaan in aanwezigheid van bètastimulatie. Hiertoe werd wederom gebruik gemaakt van phenylephrine als alpha-agonist, ditmaal in een vaso-actieve dosering van 10,0 nmol/min., aangezien tijdens voorbereidende studies een ongevoeligheid bleek in deze rattenpopulatie wat

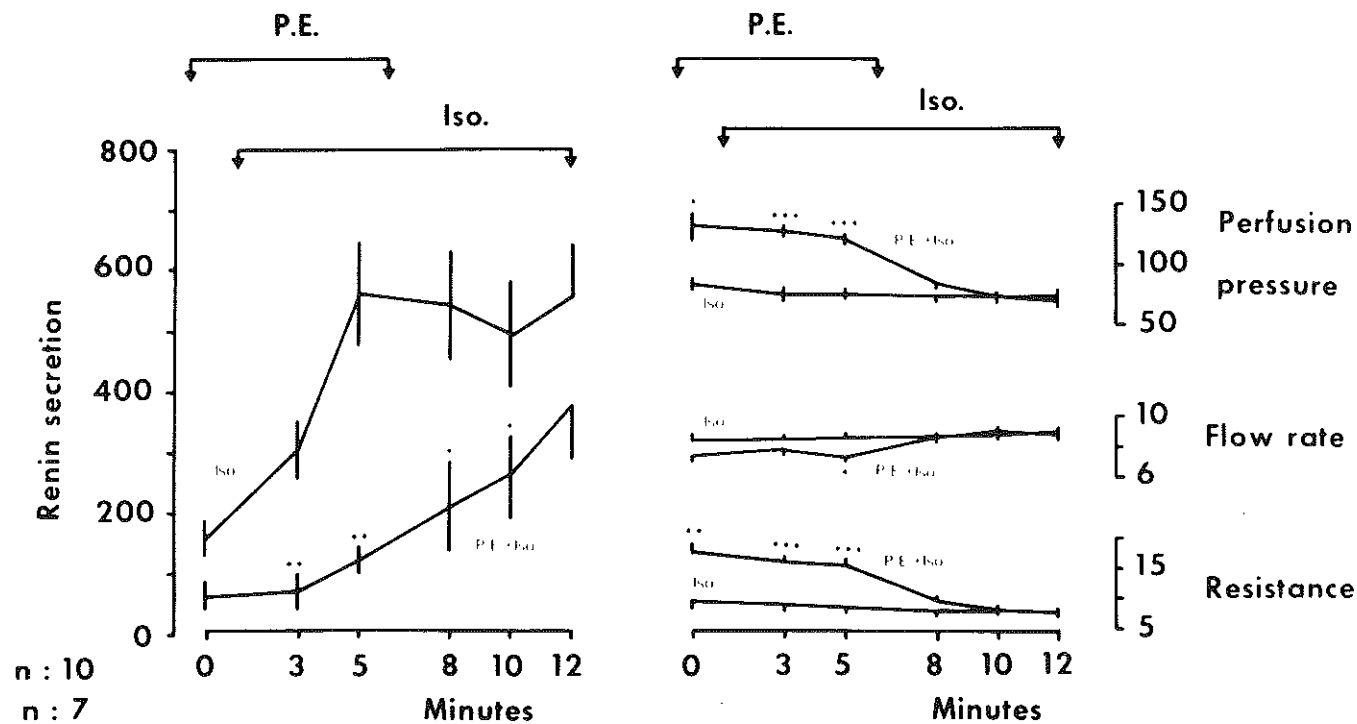


Fig.8. P.E.= phenylephrine (dosering 10,0 nmol/min; gestaakt op  $T_6$ ).  
 Iso = isoproterenol (dosering 0,03 nmol/min; toegediend vanaf  $T_1$ ).  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ . Iso n : 7; PE+Iso n : 10.

betreft de tevoren effectief vasoconstrictoire dosis phenylephrine 5,0 nmol/min.

De vaso-actieve dosering werd gekozen om een parameter in handen te hebben voor een omschreven alpha-adrenerge eigenschap.

Bij een lage dosering en het eventueel uitblijven van effect op de reninesecretie zou dit immers geweten kunnen worden aan het gebruik van een te lage dosis.

## 2. Het effect van phenylephrine op de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie

Bij het eerste experiment werd allereerst phenylephrine als enige stof (10,0 nmol/min.) geïnfundeerd, hetgeen resulteerde in een duidelijke drukstijging (fig.8).

Wanneer de druk zich had gestabiliseerd werd het eerste monster afgenomen voor reninebepaling en geregistreerd als tijdstip 0.

Eén minuut na  $T_0$  werd isoproterenol geïnfundeerd (0,03 nmol/min.). Dit werd gedurende het gehele experiment doorgegeven, terwijl de toediening van phenylephrine zes minuten na  $T_0$  werd gestaakt.

Als controle werd alléén isoproterenol (0,03 nmol/min.) geïnfundeerd vanaf 1 minuut na  $T_0$  (fig.8).

Het blijkt dat infusie met phenylephrine op zich geen statistisch significant verschil in reninesecretie veroorzaakt getuige de waarneming op  $T_0$ . De druk daarentegen is duidelijk verhoogd evenals de vaatweerstand. De nierdoorstroming is niet verschillend van de controles met een uitzondering geregistreerd op  $T_5$ , waar tijdens infusie met phenylephrine een éénmalige, juist significant verlaagde nierdoorstroming werd geregistreerd.

De procentuele doorstromingsverandering tijdens infusie met phenylephrine ( $T_0$ - $T_5$ ) verschilt niet met de controles, resp.  $3\% \pm 4$  en  $2\% \pm 2$  ( $p > 0,05$ ). De reninesecretie is tijdens toediening van phenylephrine in combinatie met

isoproterenol significant lager dan tijdens toediening van isoproterenol alléén.

Het toedienen van isoproterenol heeft geen meetbaar effect op de druk en nierdoorstroming.

Na het staken van de phenylephrine op  $T_6$  vindt direct een normalisatie plaats van druk en vaatweerstand. De reninesecretie blijft echter ondanks normalisatie van druk en vaatweerstand nog enige tijd verlaagd ten opzichte van de contrôles.

Het remmen van de reninesecretie blijkt dus een proces te zijn dat zich langzamer herstelt dan de vaatrespons.

Het beloop in reninesecretie bij de contrôles laat een aanloopfase zien met het bereiken van een plateau, wijzend op een voor de gebruikte dosering maximale secretie.

De procentuele toename ( $T_0-T_{12}$ ) in reninesecretie ( $987 \pm 364$ ) is niet significant verschillend ten opzichte van de contrôles met isoproterenol alléén ( $529 \pm 213, p > 0,05$ ), hetgeen wijst op een herstel van de reninesecretie na de initiële remming, wat zich ook al uit in de niet meer significant verschillende secretie op  $T_{12}$ .

### 3. De invloed van phenoxybenzamine op de geremde reninesecretie

Om na te gaan of hier inderdaad sprake was van een zuiver alpha-adrenerg effect werd het experiment ook uitgevoerd met phenoxybenzamine als alpha-antagonist.

Theoretisch zou nog de mogelijkheid bestaan van een competitieve inhibitie door zeer geringe bèta-adrenerge eigenschappen van het phenylephrine. Er zou dan een situatie kunnen bestaan zoals bij de proeven van Weinberger et al. (1975). Deze onderzoekers maakten gebruik van de alpha-agonist methoxamine en konden geen effect door middel van een eventuele prikkeling van de alphareceptor op de reninesecretie waarnemen. Wel bestond er een remmend



effect van het methoxamine op de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie. Dit werd toegeschreven aan competitieve inhibitie via een zwakke bèta-adrenerge eigenschap van het methoxamine.

Wanneer de effecten, veroorzaakt door phenylephrine, zijn toe te schrijven aan zijn alpha-adrenerge eigenschap, dan zou phenoxybenzamine in staat moeten zijn deze effecten teniet te doen.

Ter beantwoording van bovenstaande vraagstelling werden phenylephrine (10,0 nmol/min.) en phenoxybenzamine (7,5 nmol/min.) tegelijk geïnfundeerd. Na stabilisatie van de druk werd het experiment gestart met het nemen van monsters en de registratie van de druk en de doorstroming op  $T_0$  (fig.9). Op  $T_1$  werd isoproterenol (0,03 nmol/min.) geïnfundeerd.

De waarnemingen werden vergeleken met die van de toediening van isoproterenol alléén (fig.8).

Het blijkt dat de uitgangswaarden geen verschillen laten zien in reninesecretie, nierdoorstroming, perfusiedruk en niervaatweerstand ten opzichte van de contrôles. Het nier-vaatgedrag gold als maat voor de effectiviteit van het alpha-antagonistische effect van phenoxybenzamine.

Na toediening van isoproterenol blijkt ook geen verschil in reninesecretie op te treden ten opzichte van de contrôles, waarbij alléén isoproterenol werd toegediend, evenmin in de procentuele toename  $T_0$ - $T_5$  resp.  $277 \pm 128$  en  $686 \pm 348$  ( $p > 0,05$ ).

Er werd evenmin een verschil waargenomen in perfusiedruk, nierdoorstroming en niervaatweerstand. De procentuele veranderingen van deze parameters in vergelijking met de contrôle-waarnemingen ( $T_0$ - $T_5$ ) waren als volgt:  
perfusiedruk:  $-4 \pm 2$  vs.  $-8 \pm 4$  ( $p > 0,05$ ), nierdoorstroming:  $8 \pm 5$  vs.  $2 \pm 2$  ( $p > 0,05$ ), niervaatweerstand:  $-11 \pm 4$  vs.  $-9 \pm 4$  ( $p > 0,05$ ).

Op  $T_6$  werden phenoxybenzamine en phenylephrine gestaakt

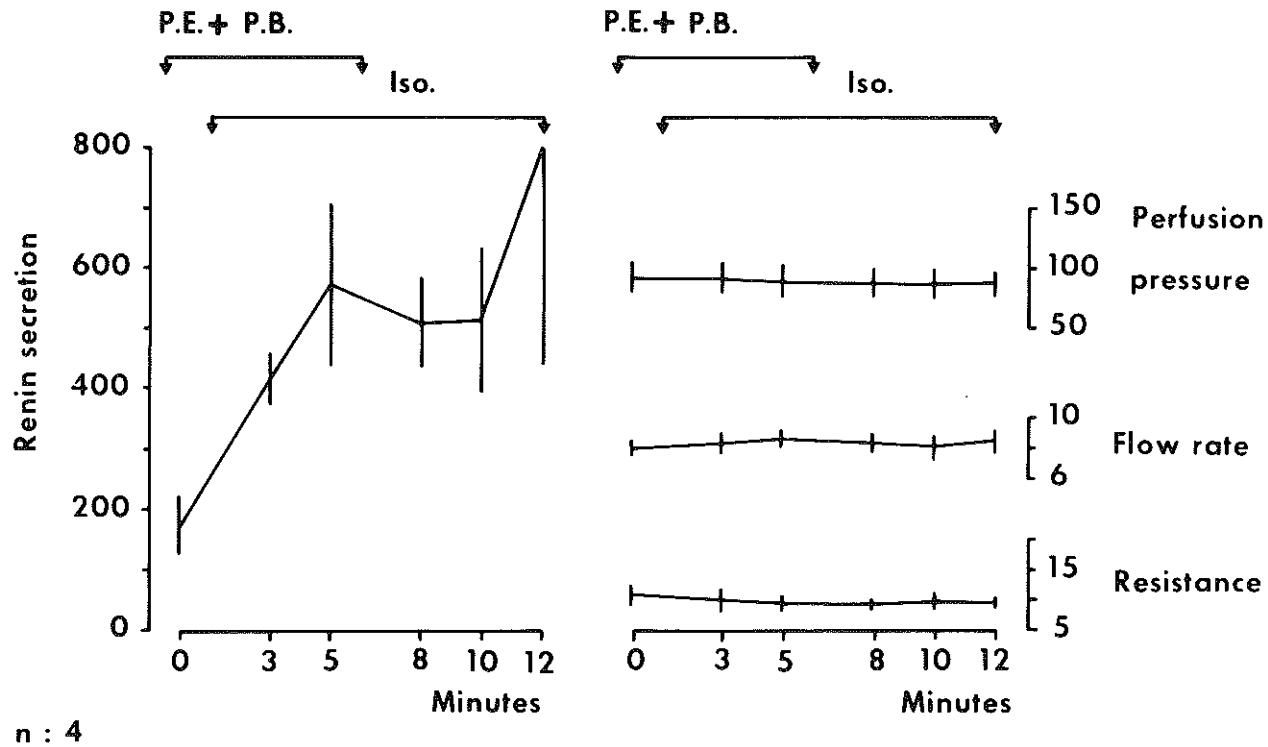


Fig.9. PE. = phenylephrine (dosering 10,0 nmol/min; gestaakt op  $T_6$ ).  
 PB = phenoxybenzamine (dosering 7,5 nmol/min; gestaakt op  $T_6$ ).  
 Iso = isoproterenol (dosering 0,03 nmol/min; toegediend vanaf  $T_1$ ).

zonder invloed op de reninesecretie of het niervaatgedrag. Ook over de gehele observatieperiode bezien was de procentuele verandering van de reninesecretie ( $T_0-T_{12}$ ) niet verschillend van de contrôles:  $464 \pm 309$  vs.  $529 \pm 213$  ( $p > 0,05$ ). Hetzelfde geldt voor de perfusiedruk:  $-6 \pm 2$  vs.  $-11 \pm 3$  ( $p > 0,05$ ), nierdoorstroming:  $6 \pm 4$  vs.  $7 \pm 3$  ( $p > 0,05$ ) en niervaatweerstand:  $-12 \pm 5$  vs.  $-9 \pm 4$  ( $p > 0,05$ ).

#### 4. De invloed van de volgorde van toediening van de pharmaca

Gezien het remmend effect van de alpha-agonist phenylephrine op de reninesecretie wanneer het voorafgaande aan isoproterenol werd toegediend, werd ook nagegaan of het mogelijk was de reeds door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie te remmen.

Hiertoe werd na het afnemen van het eerste monster op  $T_0$  isoproterenol ( $0,03$  nmol/min.) geïnfundeerd op  $T_1$  en bovendien phenylephrine ( $10,0$  nmol/min.) op  $T_6$  (fig.11). De uitgangswaarde toont geen verschil in reninesecretie in vergelijking met de contrôles (voorafgaande aan toediening van isoproterenol alléén, fig. 10). Evenmin zijn er aan het begin van het experiment verschillen in nierperfusiedruk, niervaatweerstand en nierdoorstroming. Na toedienen van isoproterenol vinden in beide series gelijke veranderingen plaats.

Na toedienen van phenylephrine op  $T_6$  wordt direct een stijging van de perfusiedruk zichtbaar. De toename in de periode  $T_5-T_8$  bedraagt  $21\% \pm 8$  en is significant verschillend van de drukverandering, die in de periode  $T_5-T_8$  wordt waargenomen bij toediening van isoproterenol alléén:  $-2\% \pm 4$  ( $p < 0,05$ ).

Ook de drukverandering over de gehele perfusieperiode ( $T_5-T_{14}$ ) met phenylephrine ( $+38\% \pm 10$ ) is significant verschillend van die in de contrôle-serie ( $-3\% \pm 5$ ,  $p < 0,001$ ).

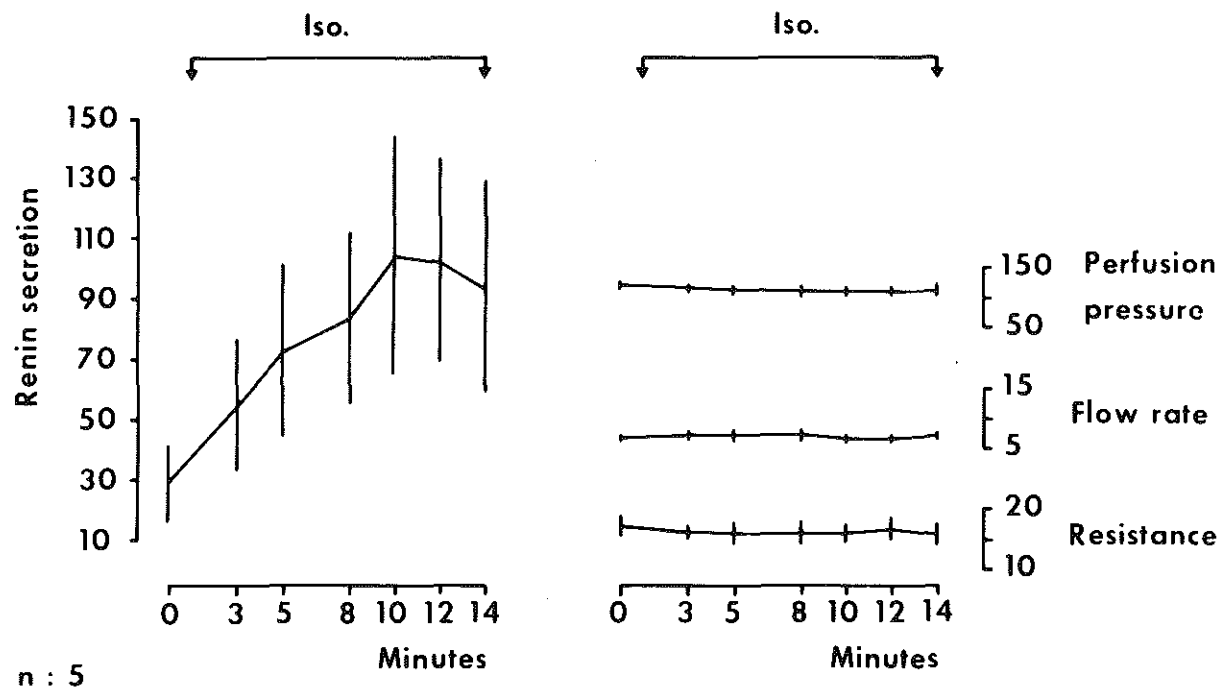


Fig.10. Iso = isoproterenol (dosing 0,03 nmol/min, vanaf  $T_1$ ).

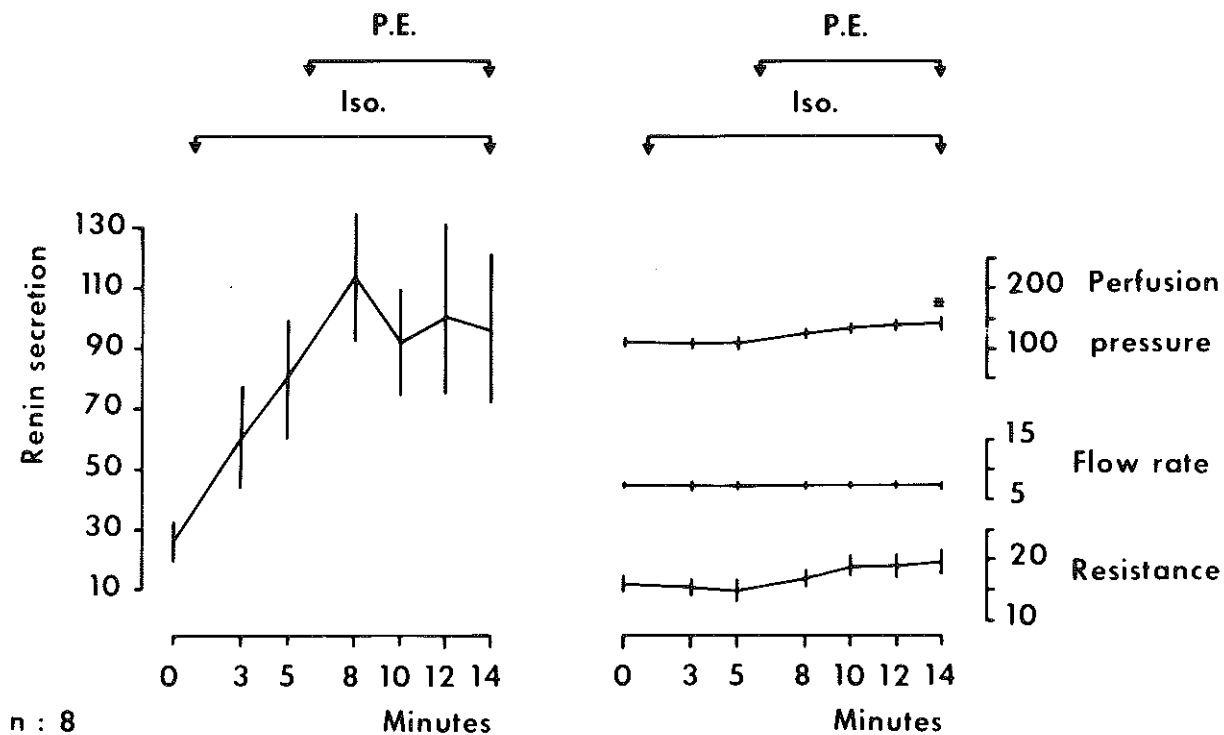


Fig.11. Iso = isoproterenol (dosing 0,03 nmol/min; vanaf  $T_1$ ).  
 PE = phenylephrine (dosing 10,0 nmol/min; vanaf  $T_6$ ).  
 \*  $p < 0,05$ .

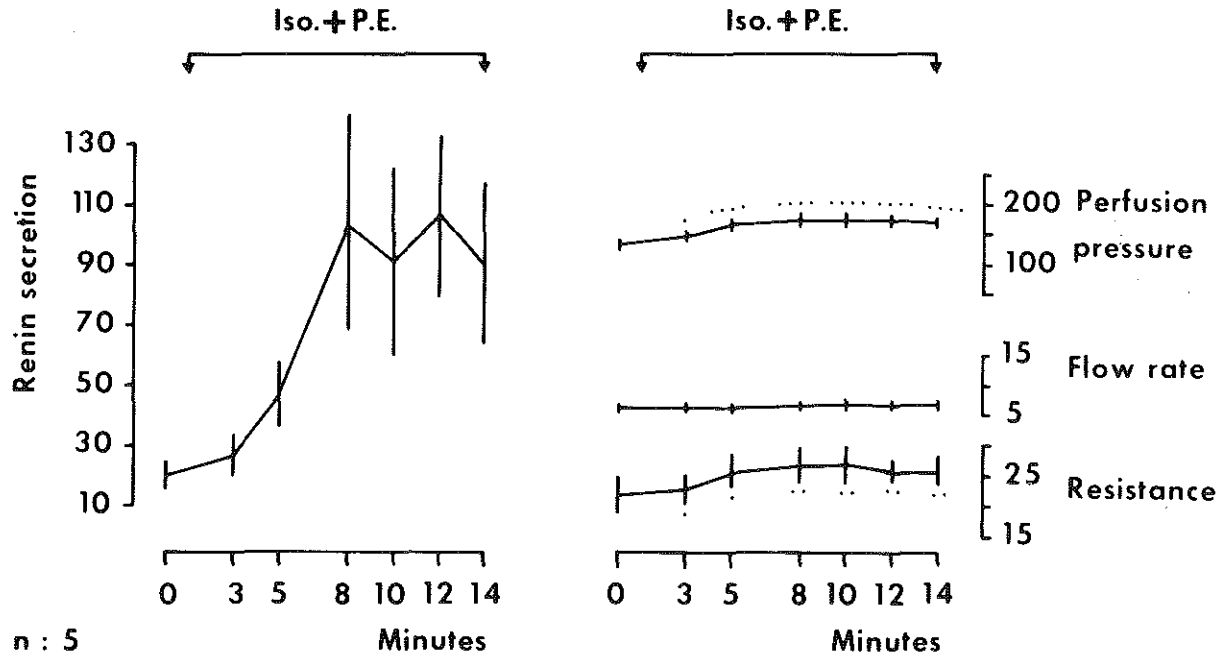


Fig.12. Iso = isoproterenol (dosing 0,03 nmol/min; vanaf  $T_1$ ).  
 PE = phenylephrine (dosing 10,0 nmol/min; vanaf  $T_1$ ).  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*\*  $p < 0,001$ .

De nierdoorstroming verloopt in beide series parallel: resp.  $2\% \pm 5$  en  $1\% \pm 4$  ( $p > 0,05$ ).

De niervaatweerstand nam tijdens toediening van phenylephrine toe met  $37\% \pm 12$ , terwijl zich in de contrôle-serie geen verandering voordeed ( $-1 \pm 5\%$ ). Het verschil tussen beide patronen was significant ( $p < 0,05$ ), dit gold niet voor de absolute waarden van de niervaatweerstand. Desondanks werd er geen verschil in reninesecretie waargenomen. De verandering in de periode  $T_5-T_{14}$  ten opzichte van de contrôle-groep is  $62\% \pm 56$  vs.  $70\% \pm 49$  ( $p > 0,05$ ).

Bovenstaand resultaat duidt er op, dat de alpha-agonist phenylephrine ondanks vasoconstrictie niet in staat is een reeds door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie te remmen. In verband hiermee deed zich de vraag voor, welk effect phenylephrine teweeg zal brengen indien het tegelijk met isoproterenol wordt toegediend. Het zou namelijk tot de mogelijkheden behoren dat de reeds tot secretie gestimuleerde juxtaglomerulaire cel zich moeilijk laat remmen.

Hiertoe werden op  $T_1$  isoproterenol ( $0,03$  nmol/min.) en phenylephrine ( $10,0$  nmol/min.) tegelijk geïnfundeerd (fig.12). De veranderingen in nierperfusiedruk en niervaatweerstand ( $T_0-T_{14}$ ) waren tijdens toediening van phenylephrine duidelijk verhoogd ten opzichte van de contrôle-groep. Ook ditmaal liet de reninesecretie geen verschil zien ten opzichte van de contrôle-groep, waar alléén isoproterenol werd toegediend (fig.10). De procentuele toename in de periode  $T_0-T_{14}$  (resp.  $563 \pm 350$  en  $379 \pm 182$ ) was niet verschillend ( $p > 0,05$ ).

## 5. Discussie

Aangezien kan worden verondersteld, dat onder fysiologische omstandigheden een evenwicht tussen alpha- en bèta-adrenerge stimulatie bestaat, werd het effect nagegaan van een alpha-

werd toegediend. Het uitblijven van een dergelijke remming bij gelijktijdige infusie van phenylephrine en isoproterenol wijst er op, dat de juxtaglomerulaire cel een grotere affiniteit heeft voor de bèta-agonist dan voor de alpha-agonist.

Phenoxybenzamine was in staat het remmend effect van phenylephrine op de reninesecretie teniet te doen. Hieruit kan worden afgeleid, dat de remming afhankelijk is van de alpha-adrenerge eigenschap als zodanig.



## Hoofdstuk VI

### Het alpha-adrenerge effect op de reninesecretie na eliminieren van de vaatreactie

- 1) Inleiding.
- 2) Het effect van dihydraalazine op de reninesecretie.
- 3) Het effect van phenylephrine op de reninesecretie  
na uitschakelen van de vaatreactie.
- 4) Discussie.
- 5) Samenvatting.

## Hoofdstuk VI

### Het alpha-adrenerge effect op de reninesecretie na eliminieren van de vaatreactie

#### 1. Inleiding

In het vorige hoofdstuk werd een remmend effect aangetoond van de alpha-agonist phenylephrine op de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie. Aangezien dit effect mogelijk secundair kan zijn aan de vaatreactie, zochten wij naar een mogelijkheid de vaatreactie uit te schakelen, om aldus het alpha-adrenerge effect als zodanig op de reninesecretie te kunnen bepalen.

Hiervoor lieten wij het oog vallen op de vaatverwijder dihydralazine, die een direct relaxerende werking op de gladde spier heeft.

De hydralazinophtalazines worden gebruikt voor bloeddrukverlaging op basis van directe arteriolaire dilatatie. De twee belangrijkste derivaten zijn 1-hydrazinophtalazine (hydralazine) en 1,4-dihydrazinophtalazine (dihydralazine). Dit bloeddrukverlagende effect gaat gepaard met en wordt in feite doorkruist door een verhoogde sympathische activiteit (Koch-Weser, 1976; Van Zwieten, 1968; Werner et al., 1975; Pettinger en Keeton, 1975; Zacest en Koch-Weser, 1972). Wanneer hydralazine via de algemene bloedsomloop inwerkt vindt doorgaans een verhoging van de reninesecretie plaats (Voudoukis, 1966; Pettinger et al., 1973; Pettinger en Keeton, 1975; Werner et al., 1975). Alleen Teichman et al. (1974) konden een dergelijke stijging niet waarnemen, zelfs wanneer zich een bloeddrukdaling met reflectoire tachycardie voordeed.

Voudoukis (1966) geeft aan, dat de reninesecretie tengevolge van hydralazine toediening niet op propranolol reageert. Hij veronderstelt dat hydralazine de reninesecretie door een direct renaal mechanisme stimuleert.

Hierbij wordt gedacht aan een verandering in nierdoorbloedingspatroon.

Uit de meeste onderzoeken blijkt echter, dat de verhoogde reninesecretie door propranolol kan worden geremd, hetgeen wijst op een bemiddeling door het bèta-adrenerge systeem (Pettinger et al., 1973; Pettinger en Keeton, 1974; Werner et al., 1975).

Dit wordt langs een andere weg bevestigd door Ueda et al. (1970). Zij vonden bij algemene toediening van hydralazine een verhoogde reninesecretie. Bij een patiënt met een getransplanteerde nier bleef dit effect echter uit! Directe inspuiting in de a.renalis gaf evenmin een verhoging van de reninesecretie.

De auteurs leidden hieruit af, dat de reninestijging, welke plaats vindt na toedienen van hydralazine, grotendeels wordt veroorzaakt door reflectoir toegenomen sympathische activiteit.

Men mag dan ook concluderen, dat hydralazine bij algemene toediening een verhoging van de reninesecretie veroorzaakt. Deze werking berust waarschijnlijk overwegend op een reflectoir toegenomen sympathische activiteit, al kan niet met zekerheid worden ontkend dat renale haemodynamische veranderingen als zodanig mede van invloed kunnen zijn.

Toen wij de toepassing van dihydralazine in onze proefopstelling invoegden, stond ons in eerste instantie voor ogen een zodanige directe vaatrelaxatie tot stand te brengen, dat phenylephrine geen vasoconstrictie meer zou kunnen veroorzaken. Blijkens het literatuuronderzoek stond echter het effect van deze stof op de geïsoleerde rattenier geenszins bij voorbaat vast. Daarom diende de werking van deze stof op ons model, waarvan het aannemelijk is dat een neurogene vaattonusregulatie ontbreekt, te worden getoetst.

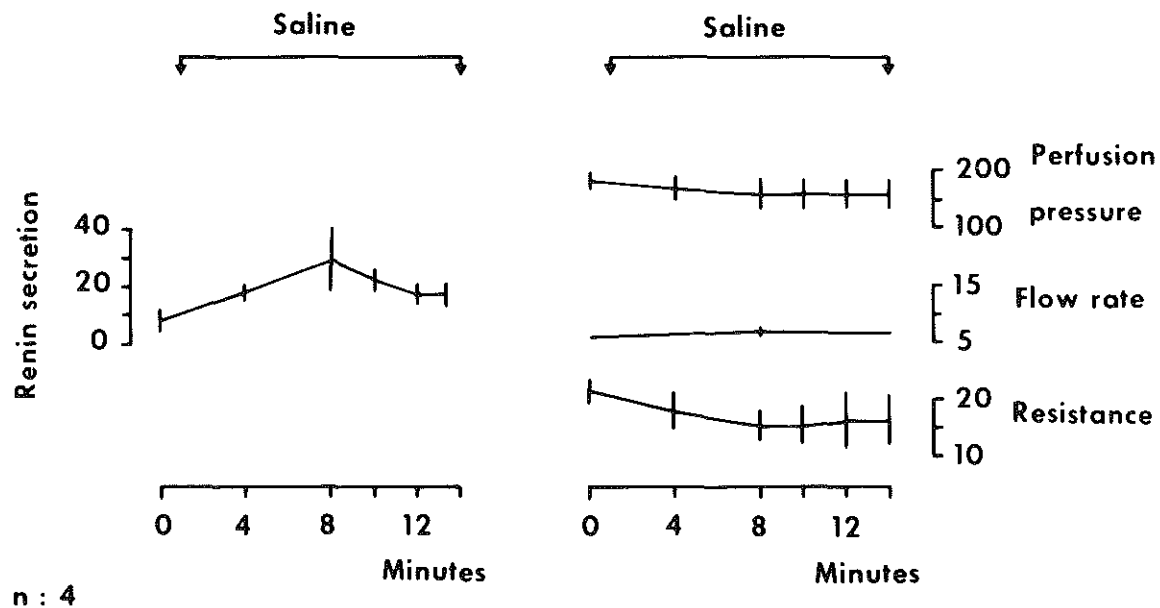


Fig.13. Fysiologisch zoutinfuus vanaf  $T_1$ . De infusiesnelheid van het fysiologisch zout is gelijk aan de infusiesnelheid van de pharmaca.

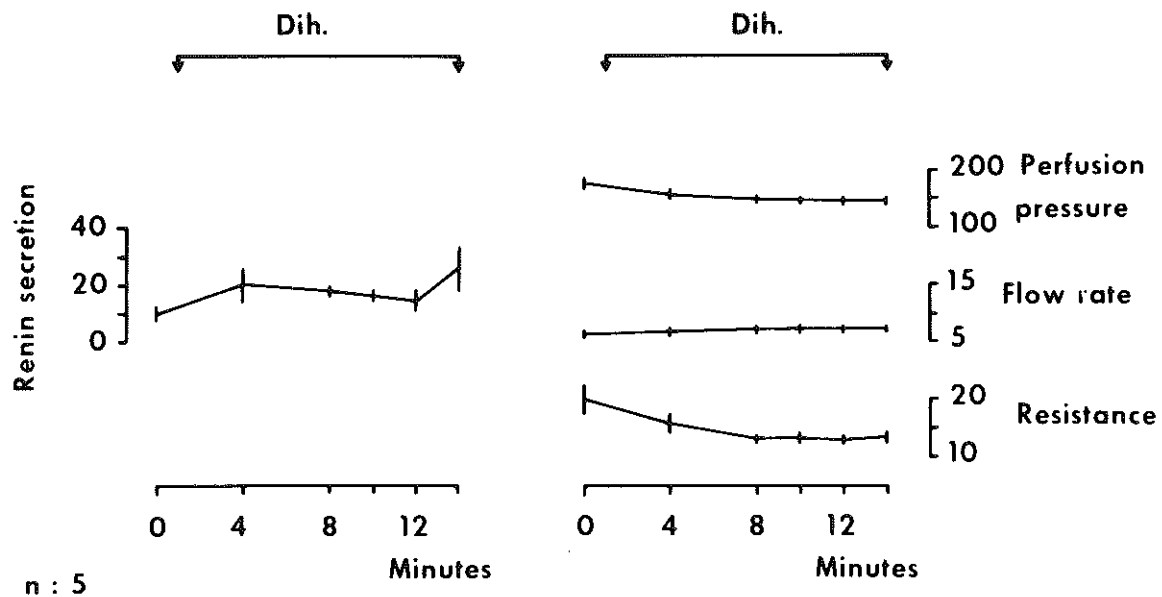


Fig.14. Dih.= dihydralazine (dosering 117 nmol/min; vanaf  $T_1$ ).

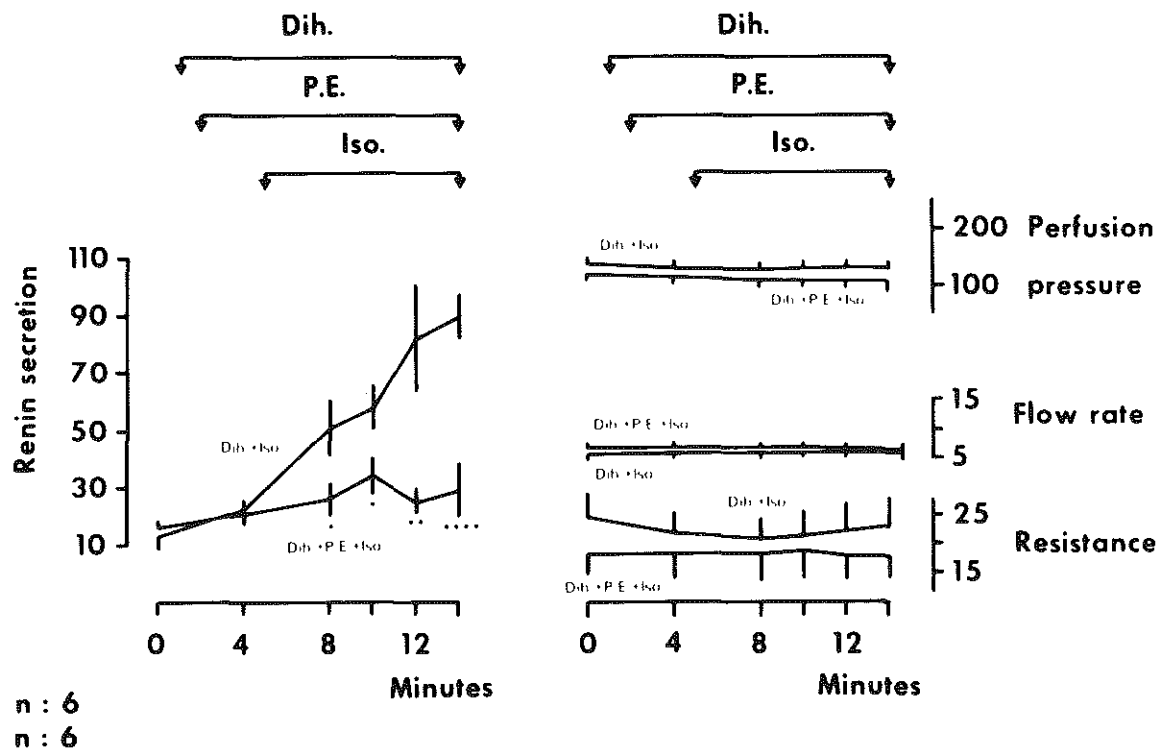


Fig.15. Dih.= dihydropyridine (dosing 117 nmol/min; vanaf  $T_1$ ).  
 PE = phenylephrine (dosing 10,0 nmol/min (n=2) en 2,5 nmol/min (n=4);  
 vanaf  $T_2$ ).  
 Iso = isoproterenol (dosing 0,03 nmol/min; vanaf  $T_5$ ).  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

## 2. Het effect van dihydalazine op de reninesecretie

Het toedienen van dihydalazine 117 nmol/min. vanaf  $T_1$  (fig.14) toonde geen verschil in reninesecretie met de contrôles (fig.13), resp.  $418\% \pm 252$  en  $205\% \pm 116$  ( $p > 0,05$ ) over 14 minuten.

Evenmin konden verschillen worden aangetoond in druk, resp.  $-25\% \pm 4$  en  $-19\% \pm 11$  ( $p > 0,05$ ), nierdoorstroming resp.  $10\% \pm 3$  en  $9\% \pm 4$  ( $p > 0,05$ ) en niervaatweerstand resp.  $-32\% \pm 4$  en  $-26\% \pm 11$  ( $p > 0,05$ ).

## 3. Het effect van phenylephrine op de reninesecretie na uitschakelen van de vaatreactie

Nadat gebleken was dat dihydalazine in onze proefopstelling geen effect had op de reninesecretie, werd vervolgens weer het effect nagegaan van phenylephrine (10,0 nmol/min., ( $n=2$ ) en 2,5 nmol/min. ( $n=4$ )) op de door isoproterenol (0,03 nmol/min.) gestimuleerde reninesecretie, terwijl dihydalazine (117 nmol/min.) de vaatrespons van phenylephrine voorkwam (fig.15).

Hiertoe werd na het stabiliseren van de druk het eerste monster op  $T_0$  afgenomen en vervolgens na 1 minuut dihydalazine toegediend. Infusie van phenylephrine en isoproterenol vond plaats op resp.  $T_2$  en  $T_5$ .

Als contrôle werd wederom dihydalazine 117 nmol/min. toegediend op  $T_1$ , terwijl vervolgens alleen isoproterenol 0,03 nmol/min. werd toegediend op  $T_5$  (fig. 15).

De reninesecretie bij aanvang van het experiment verschilt niet. Na het toedienen van phenylephrine op  $T_2$  treden er nu geen veranderingen op in de perfusiedruk. De afname in perfusiedruk ten opzichte van de contrôles ( $T_0-T_{14}$ ) is  $-10\% \pm 4$  vs.  $-7\% \pm 4$  ( $p > 0,05$ ). De niervaatweerstand neemt af met resp.  $-5\% \pm 8$  vs.  $-8\% \pm 7$  ( $p > 0,05$ ). De doorstromingsverandering is resp.  $-2\% \pm 10$  en  $3\% \pm 7$  ( $p > 0,05$ ).

Ook blijkt de reninesecretie op  $T_4$  niet te verschillen met de contrôles ofschoon op dit tijdstip gedurende 2 minuten

phenylephrine-infusie heeft plaats gevonden.

Na het toedienen van isoproterenol blijkt reeds bij de eerstvolgende waarneming op  $T_8$  (dit is 3 minuten na het toedienen van isoproterenol) een significante toename in reninesecretie zichtbaar te worden. Deze tendens zet zich voort gedurende het verdere verloop van het experiment. De toename in secretie tijdens de experimenten met phenylephrine is  $47\% \pm 47$ , bij de experimenten zonder phenylephrine is dit  $367\% \pm 110$  ( $p < 0,05$ ).

Er blijkt derhalve ook hier een duidelijk remmend effect van phenylephrine op de reninesecretie aantoonbaar te zijn.

#### 4. Discussie

Het blijkt dat dihydrylazine intrarenaal geïnfundeerd, geen effect heeft op de reninesecretie ten opzichte van controle-waarnemingen. Een significant effect op de nierperfusiedruk en niervaatweerstand was niet waarneembaar, ofschoon de gemiddelde afname van deze parameters, zoals steeds gezien bij de controle-waarnemingen, in de groep met dihydrylazine meer constant en uitgesproken leek. Waarschijnlijk is dit ontbreken van een duidelijk haemodynamisch effect toe te schrijven aan het ontbreken van een sympathische vaattonus door denervatie.

Het ontbreken van effect van dihydrylazine op de reninesecretie, wanneer het middel intrarenaal wordt toegediend, komt overeen met de bevindingen van Ueda et al. (1970).

Het meest waarschijnlijk lijkt dan ook dat de toegenomen reninesecretie na algemene toediening het resultaat is van reflectoir verhoogde sympathische activiteit (Pettinger et al., 1973; Pettinger en Keeton, 1975; Werner et al., 1975; Ueda et al., 1970).

Het tweede gedeelte van het experiment toonde aan, dat het na uitschakeling van de vaatrespons toch mogelijk is de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie te remmen.



Aangezien uit het onderzoek in hoofdstuk V reeds gebleken was dat het effect een zuiver alpha-adrenerg karakter heeft, kon thans worden gesproken van een direct remmende werking van de alpha-agonist door middel van een alpha-receptor van de juxtaglomerulaire cel.

Dit direct remmende effect van phenylephrine op de reninesecretie komt vooral overeen met het remmende effect van alpha-adrenerge stimuli, zoals dit werd waargenomen door ratteniercouples te incuberen met norepinephrine en epinephrine. Het remmend effect van deze stoffen werd teniet gedaan door phenoxybenzamine (Capponi en Vallotton, 1976) en kon op grond daarvan worden gedefinieerd als een alpha-adrenerge werking.

Wel dient men voor ogen te houden dat de vaatreactie bij de niercouples nog steeds mogelijk is. Dit kan leiden tot een beïnvloeding van de rekreceptor, zodat zeker niet gesproken mag worden van een direct effect op de juxtaglomerulaire cel.

De resultaten wijzen er op dat de stimulerende functie van het sympathische zenuwstelsel op de reninesecretie moet worden toegeschreven aan de bèta-adrenerge component.

Een stimulerende rol blijkt voor de alpha-adrenerge component van het sympathisch zenuwstelsel niet te zijn weggelegd. De veronderstelling van Winer (1969), Leenen (1975) en Fray (1976) is op grond van onze resultaten te verwerpen.

## 5. Samenvatting

De resultaten van hoofdstuk V terzake van de remmende werking van de alpha-agonist phenylephrine op de reninesecretie (een specifiek alpha-adrenergisch effect) werden in dit hoofdstuk verder uitgewerkt.

Om te differentiëren tussen een door het vaatgedrag bepaalde en een direct alpha-adrenerge remming van de reninesecretie, gingen wij het effect na van de alpha-agonist na uitschake-

ling van de vaatrespons met dihydralazine.

Dihydralazine, intrarenaal toegediend, had geen effect op de reninesecretie.

Na het uitschakelen van de vaatreactie door toepassing van dihydralazine bleek phenylephrine onveranderd in staat te zijn de reninesecretie te remmen. Dit houdt in, dat de alpha-adrenerge stof direct op de juxtaglomerulaire cel inwerkt, en wel op een aldaar aanwezige alpha-receptor.

## Hoofdstuk VII

### Onderzoek naar inactief renine versus actief renine

- 1) Inleiding.
- 2) Methode van onderzoek.
- 3) Resultaten
  - a. ratteplasma
  - b. contrôle perfusaat monsters
  - c. monsters met gestimuleerde reninesecretie
  - d. monsters met geremde reninesecretie.
- 4) Discussie.
- 5) Samenvatting.

## Hoofdstuk VII

### Onderzoek naar inactief renine versus actief renine

#### 1. Inleiding

De bepaling van renine in plasma wordt beïnvloed door de zuurgraad waaraan de monsters worden blootgesteld. Bij een pH range 3-4 blijkt de gevonden renineconcentratie toe te nemen. Waarschijnlijk berust dit op een activering van een (relatief) inactieve voorvorm van renine, het zogenaamde inactieve renine. Dit inactieve renine wordt omgezet in het kleinere actieve molecuul renine. Het aldus bepaalde renine wordt aangegeven als het "totale renine". Daarentegen wordt de gevonden hoeveelheid renine na behandeling met een pH range 4,5-7,5 als actief renine aangegeven. Het verschil tussen het totale renine en het actieve renine wordt inactief renine genoemd (Lumbers, 1970; Skinner et al., 1975; Leckie en McConnell, 1975; Derkx et al., 1976).

Inactief renine is aangetoond in nierextract van het konijn (Leckie en McConnell, 1975), het varken (Boyd, 1974) en de rat (Morris en Johnston, 1976).

Ofschoon de biologische betekenis van het inactieve renine niet bekend is, werd door ons de renale secretie van actief- en inactief renine door de geïsoleerde nier nagegaan. Deze gegevens werden vergeleken met de verhouding in ratteplasma.

Verder poogden wij vast te stellen in hoeverre een eventuele verschuiving van de verhouding actief/inactief renine bepalend zou kunnen zijn voor het verloop van de reninesecretie zoals gevonden in onze experimenten.

Derkx et al. (1976) toonden namelijk bij mensen een hogere concentratie inactief renine aan in niervenebloed dan in perifere veneus bloed. Verder vonden deze auteurs dat na

stimulering van de reninesecretie (door middel van kliepen, isoproterenol, diazoxide), het actieve plasma renine toenam en het inactieve plasma renine afnam. Daarentegen nam het inactieve renine toe en het actieve renine af na suppressie van de reninesecretie met propranolol. Er bleek een aanzienlijke individuele variatie te bestaan in de verhouding inactief/actief renine. Boyd(1974) vond bij de in situ geïsoleerd geperfundeerde varkensnier met Krebs-Ringer oplossing, dat het contrôle-perfusaat voor en na acidificatie geen verschil in de gevonden hoeveelheid renine veroorzaakte, de nier secerneerde slechts actief renine. Daarentegen vond na stimulatie van de reninesecretie met isoproterenol wel een verandering plaats. Na acidificatie bleek het reninegehalte duidelijk te zijn toegenomen, hetgeen wijst op secretie van inactief renine.

## 2. Methode van onderzoek

De monsters werden op de gebruikelijke wijze verkregen uit de uitstroomvloeistof. Monsters met een gestimuleerde reninesecretie werden verkregen na infusie van isoproterenol (0,05 nmol/min.). De monsters voor de geremde reninesecretie werden verkregen na infunderen van phenylephrine (10,0 nmol/min.) en vervolgens isoproterenol (0,03 nmol/min.) zoals beschreven in hoofdstuk V.

Contrôle-monsters werden genomen uit de uitstroomvloeistof onder zogenaamde basale omstandigheden.

Bloed werd opgevangen in heparine uit de vena cava inferior bij een andere groep geanaestheseerde ratten.

Aangezien renine mogelijk kan worden geactiveerd door bevriezen of lang in koude bewaren (Sealy et al., 1976) werden de monsters op 4°C gehouden en dezelfde dag gedialyseerd.

Gedeelten van één monster werden op de volgende wijze behandeld: het totale renine werd bepaald door de monsters

gedurende 24 uur op 4°C bij pH 3,3 te dialyseren met buffer A volgens Skinner (1967); Na verwarmen op 32°C gedurende 30 minuten werden de monsters gedurende 24 uur gedialyseerd bij pH 7,5 met buffer C. Voor de bepaling van het actieve renine werden de monsters eerst gedialyseerd bij pH 4,5 met buffer B gedurende 24 uur en op 4°C en vervolgens verwarmd en gedialyseerd bij pH 7,5 als bij totaal renine. Beide procedures resulteren in een complete remming van angiotensinase activiteit (Skinner, 1967). De renineconcentratie werd weer bepaald door middel van radio immuno assay van Angiotensine I gegenereerd bij pH 7,5 en 37°C gedurende 3 uur met overmaat rattesubstraat.

### 3. Resultaten

#### 3a. Ratteplasma

In perifeer plasma bleek het totale renine steeds hoger dan het actieve renine (fig.16). De gemiddelde waarden waren resp.  $52 \pm 7$  en  $40 \pm 6$  nmol h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> ( $p < 0,001$ ). Het verschil dat het inactieve renine aangeeft was  $12 \pm 2$  nmol h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup>. Er was een goede correlatie tussen totaal en actief renine ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,001$ ).

#### 3b. Contrôle perfusaat monsters

Bij de contrôle-monsters van 12 nierperfusaten was het totale renine in het perfusaat niet significant verschillend van het actieve renine (fig.16). De gemiddelde waarden waren resp.  $20 \pm 6$  en  $24 \pm 7$  nmol h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ ).

#### 3c. Monsters met gestimuleerde reninesecretie

Gedurende stimulatie met isoproterenol (0,05 nmol/min. gedurende 5 min.) bij vijf experimenten bereikten de gemiddelde renineconcentraties de volgende waarden:  $73 \pm 22$  nmol h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> voor het totale en  $82 \pm 19$  nmol h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> voor het actieve renine ( $p > 0,05$ ).

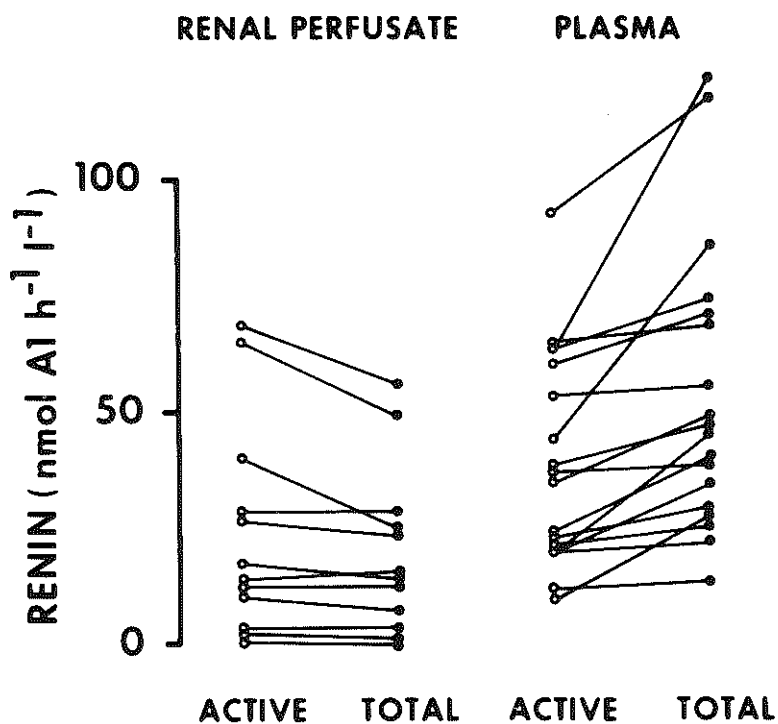


Fig.16. Concentratie van actief en totaal renine in monsters uitstroomvloeistof (onder basale condities verkregen) en in monsters perifeer plasma. Het ogenschijnlijk verschil tussen het actieve en totale renine in het perfusaat is niet significant.

### 3d. Monsters met geremde reninesecretie

Tijdens remming van de reninesecretie (monsters verkregen uit experimenten met infusie van phenylephrine en isoproterenol (n=5) werd voor totaal renine  $17 \pm 2 \text{ nmol h}^{-1}\text{l}^{-1}$  gevonden en voor het actieve renine  $17 \pm 1 \text{ nmol h}^{-1}\text{l}^{-1}$  ( $p > 0,05$ ).

### 4. Discussie

De resultaten tonen duidelijk de aanwezigheid aan van een inactief renine in het perifere ratteplasma, dat kan worden geactiveerd door behandeling bij pH 3,3. Ofschoon zeer variabel (4 - 63%), is het gemiddelde aandeel van inactief renine in het totale renine 15%. Dit is minder dan in menselijk plasma, waar het inactieve deel meestal meer dan 50% bedraagt. (Skinner et al., 1975; Derkx et al., 1976; Boyd, 1977).

Anaesthesie veroorzaakt een stijging van de renineconcentratie (Pettinger et al., 1975a) en kan misschien een proportioneel grotere stijging veroorzaken van actief renine zonder verandering (of zelfs gepaard gaande met een daling) van het inactieve renine. Men zou zulks althans kunnen veronderstellen naar analogie van de waarneming tijdens stimuleren van de reninereactie bij de mens (Derkx et al., 1976).

Er werd bij geen van onze experimenten inactief renine aangetoond in het perfusaat. Dit kan er op wijzen dat dit ratte-nierpreparaat uitsluitend actief renine secerneert.

In ratteplasma blijkt daarentegen wel inactief renine aantoonbaar te zijn en dit zou kunnen wijzen op een extrarenale bron voor het ontstaan van inactief renine. Het is mogelijk dat het ontbreken van secretie van inactief renine in de geïsoleerd geperfundeerde rattenier aan de diersoort gebonden is.

Echter, de aanwezigheid van inactief renine in anephrische patiënten (Weinberger et al., 1976; Deheneffe et al., 1976),



doet eveneens bij de mens een extrarenale bron voor inactief renine veronderstellen. Hierbij moet worden gedacht aan de speekselklieren (Weinberger et al., 1976), aangezien een aanzienlijke hoeveelheid inactief renine is gevonden in het speeksel van anephrische patiënten.

De mogelijkheid van een klievende en/of koppelende functie van de nier, bv. in de zin van een binding van een plasma-eiwit aan het actieve renine moet ook in overweging worden genomen. Zulk een veronderstelling zou voortvloeien uit de experimenten van Boyd (1974) en Leckie (1975), die een "inhibiting protein", ontstaan na acidificatie, konden scheiden van het actieve renine. Er werd vervolgens weer een binding aangegaan met het actieve renine tijdens incubatie bij 37°C, waarna de renine activiteit afnam. De activiteit nam na acidificatie weer toe.

Het product, verkregen door combinatie van het proteïne met het actieve renine lijkt identiek te zijn aan het inactieve renine. Het ontbreken van een dergelijk eiwit in het perfusaat zou dan het ontbreken van inactief renine in de uitstroomvloeistof van onze experimenten kunnen verklaren.

Aangezien dit aspect niet van directe betekenis is voor de doelstelling van ons onderzoek, hebben wij geen pogingen ondernomen deze hypothese te toetsen.

## 5. Samenvatting

Om na te gaan of de door phenylephrine veroorzaakte remming van de reninesecretie zijn grondslag zou vinden in een verschuiving van de verhouding actief/inactief renine hebben wij monsters gesplitst en gedialyseerd volgens de methode van Skinner voor renine activiteit en renine concentratie bij resp. pH 4,5 en pH 3,3

Hiermede konden de concentraties van resp. actief renine en totaal renine worden aangegeven, waarbij het verschil als inactief renine mocht worden beschouwd.

Het blijkt dat noch bij de perfusaten uit de contrôle-proefopstelling, noch bij perfusaten genomen na remming of stimulatie, inactief renine kan worden aangetoond. Inactief renine bleek echter wel aantoonbaar te zijn in het plasma van de rat.

### Algemene samenvatting

De reninesecretie door de nier neemt toe bij verhoogde activiteit binnen het adrenergische systeem. Het is vast komen te staan, dat de bèta-adrenerge receptoren hierbij een belangrijke rol spelen. Over de betekenis van de alpha-adrenerge receptoren bestaat daarentegen verschil van opvatting.

Het hier beschreven onderzoek werd ingesteld in verband met het feit, dat de gegevens betreffende het effect van alpha-adrenerge stimuli op de reninesecretie tegenstrijdig zijn, terwijl de methoden van benadering sterk uiteenlopen. Onze proefopstelling was er op gericht de invloed te bepalen van de alpha-agonist phenylephrine op de reninesecretie door de geïsoleerd geperfundeerde rattenier (hoofdstuk III). Hierbij bleek dat phenylephrine in vasoactieve- en nonvasoactieve dosering geen invloed had op de reninesecretie wanneer het preparaat geacht werd onder basale condities te functioneren (hoofdstuk IV).

Een duidelijk stimulerend effect van alpha-adrenerge stimuli, zoals verondersteld door Winer et al. (1969), Leenen (1975) en Fray (1976), bleek dus niet aantoonbaar te zijn. Een zeer geringe stimulerende invloed van phenylepinephrine zou echter door de individuele variaties in reninesecretie gemaskeerd kunnen zijn.

Evenmin kon in deze opstelling een remming worden aangetoond; hiervoor is de uitgangssituatie echter minder geschikt. Er werd immers naar gestreefd het preparaat onder basale condities te laten functioneren.

Wil men een remmende invloed van een stof aantonen of uitsluiten, dan verdient het de voorkeur uit te gaan van een opstelling, waarin de situatie boven het basale niveau uit gaat. In verband hiermee werd het effect nagegaan van een alpha-adrenerge stimulus op de verhoogde reninesecretie, zoals deze tijdens stimulatie door de bèta-agonist isoproterenol aantoonbaar was.

Het bleek dat phenylephrine een remmende werking had op de door isoproterenol gestimuleerde reninesecretie, mits de alpha-agonist tevoren werd gegeven (hoofdstuk V). Het uitblijven van een remmend effect van phenylephrine op de reninesecretie in geval van gelijktijdige of voorafgaande toediening van isoproterenol geeft aan, dat het juxtaglomerulaire systeem een grotere affiniteit voor de bèta-agonist bezit. Dat het remmend effect inderdaad samenhangt met de specifiek alpha-adrenerge eigenschappen van het phenylephrine blijkt uit de invloed van gelijktijdige alphablokkade. Wanneer namelijk phenoxybenzamine aan het medium wordt toegevoegd, is phenylephrine niet meer in staat de reninesecretie te remmen (hoofdstuk V).

Het alpha-adrenerge effect van phenylephrine zou de reninesecretie langs twee wegen kunnen onderdrukken, namelijk via vasoconstrictie of door een rechtstreekse inwerking op de juxtaglomerulaire cel.

In een volgende phase werd daarom nagegaan of phenylephrine tijdens het remmen van de vaatrespons met dihydalazine zijn remmende invloed op de reninesecretie zou behouden. Hiertoe behoorde eerst het directe effect van dihydalazine op de reninesecretie te worden bepaald (hoofdstuk VI). Het bleek dat dihydalazine bij intrarenale infusie geen verandering veroorzaakte in de reninesecretie. Dit komt overeen met de waarneming van Ueda et al. (1970). Dihydalazine bleek voorts in staat te zijn de vasoconstrictie, zoals opgewekt door een hoge dosis phenylephrine, te voorkomen. Desondanks behield het phenylephrine het vermogen om de reninesecretie onder de beschreven omstandigheden te remmen. Hiermee is het aangrijpingspunt van de remmende werking van de alpha-agonist te definiëren als een alpha-receptor van de juxtaglomerulaire cel.

Aangezien is aangetoond, dat er naast een actief een

(relatief) inactief reninemolecuul bestaat, werd tevens nagegaan of de inhibitie door phenylephrine kon worden herleid tot een verschuiving in de verhouding tussen actief en inactief renine (Derkx et al., 1976) (hoofdstuk VII).

Hiertoe werden identieke monsters van de uitstroomvloeistof zowel bij pH 4,5 als bij pH 3,3 gedialyseerd voor de bepaling van respectievelijk actief renine en totaal renine, waarbij het verschil tussen beide de hoeveelheid inactief renine aangeeft. Het resultaat leerde, dat in geen enkele experimentele situatie (basale condities, stimulatie en remming van de reninesecretie) inactief renine kon worden aangetoond.

## Summary

It has been well-established that renin release is induced by beta-adrenergic stimulation. By contrast previous data concerning the effect of alpha-adrenergic stimulation on renin secretion are conflicting, partly because the methods of approach are different. In an attempt to clarify the mechanism(s) involved, the author investigated the effects of intrarenal administration of the alpha-agonist phenylephrine on renin secretion in the isolated perfused rat kidney-preparation (chapter III).

It appeared that phenylephrine both in vasoactive and non-vasoactive doses had no appreciable influence on renin secretion when the conditions were presumed to be basal. This indicates that alpha-adrenergic stimulation lacks the property of inducing renin release as supposed by Winer et al. (1969), Leenen (1975) and Fray (1976). Admittedly a very mild stimulating or for that matter inhibitory effect of phenylephrine could have been masked due to the interindividual variability in renin secretion. Phenylephrine in vasoactive dosage induced an increase in renal vascular resistance.

In order to detect a possibly inhibitory action of alpha-adrenergic stimulation we examined the effect of the alpha-adrenergic drug phenylephrine presented immediately before and during beta-adrenergic stimulation by isoproterenol. It was quite obvious that phenylephrine inhibited the stimulating effect of isoproterenol on renin secretion, provided that the start of the infusion of the alpha-agonist preceded the infusion of isoproterenol (chapter V). The lack of an inhibitory effect of phenylephrine as soon as it was administered after or together with isoproterenol indicates that the juxtaglomerular system possesses a greater affinity for the beta-agonist. The inhibition of renin secretion by phenylephrine was

proven to be a pure alpha-adrenergic characteristic because it was abolished by means of phenoxybenzamine (chapter V).

It was considered that phenylephrine could inhibit renine secretion in two ways: by vasoconstriction or by a direct action on the juxtaglomerular cells. In order to eliminate the vasoconstriction dihydralazine was infused.

Dihydralazine exhibited no effect on "basal" renine secretion (chapter VI). The vasoconstrictive response to phenylephrine was completely abolished. Despite the absence of vasoconstriction during dihydralazine infusion phenylephrine maintained its potency to inhibit the isoproterenol-induced stimulation of renin secretion. This finding implies that the juxtaglomerular cell contains a receptorsite for alpha-adrenergic stimulation.

The possibility was considered that the inhibition of renin secretion by phenylephrine could amount to a shift in the ratio active and inactive renin (chapter VII).

To explore the existence of inactive renin in the perfusate we dialysed samples both at pH 4.5 and at pH 3.3.

By these procedures it is possible to discriminate between active renin and total renin respectively, the difference between the two values representing inactive renin.

It appeared at varying rates of renin secretion (obtained during the "basal" state, during stimulation and during inhibition) that the existence of inactive renin could never be demonstrated.

#### LIJST VAN GERAADPLEEGDE LITERATUUR

- Anderson, R.C., P.N. Herbert and P.J. Mulrow (1968).  
A comparison of properties of renin obtained from the  
kidney and uterus of the rabbit.  
Am.J.Physiol. 215: 774.
- Assaykeen, T.A., H. Tanigawa and D.J. Allison (1974).  
Effect of adrenoceptor-blocking agents on the renin  
response to isoproterenol in dogs.  
Eur.J.Pharmacol. 26: 285.
- Barajas, L. (1964).  
The innervation of the juxtaglomerular apparatus.  
Lab.Invest. 13: 916.
- Blaine, E.H., J.O. Davis and R.L. Prewitt (1971).  
Evidence for a renal vascular receptor in control of  
renin secretion.  
Am.J.Physiol. 220: 1593.
- Blalock, A. and S.E. Levy (1937).  
Studies on the etiology of renal hypertension.  
Ann.Surg. 106: 826.
- Boyd, G.W., A.E. Fitz, A.R. Adamson and W.S. Peart (1969).  
Radioimmunoassay determination of plasma-renin activity.  
Lancet I: 213.
- Boyd, G.W. (1974).  
A protein-bound form of porcine renal renin.  
Circ.Res. 35: 426.
- Boyd, G.W. (1977).  
An inactive higher-molecular-weight renin in normal  
subjects and hypertensive patients.  
Lancet I: 215.



Braun-Menendez, E., J.C. Fasciolo, L.F. Leloir and J.M. Muñoz (1940).

The substance causing renal hypertension.  
J.Physiol. 98: 283.

Brown, J.J., D.L. Davies, A.F. Lever, R.A. Parker and J.I.S. Robertson (1963).

Assay of renin in single glomeruli; renin distribution in the normal rabbit kidney.  
Lancet II: 668.

Brunner, H.R., L. Baer and J.E. Sealy (1970).

The influence of potassium administration and of potassium deprivation on plasma renin in normal and hypertensive subjects.  
J.Clin.Invest. 49: 2128.

Campbell, W.B., S.N. Brooks and W.A. Pettinger (1974).  
Angiotensin II- and angiotensin III-induced aldosterone release in vivo in the rat.  
Science 184: 994.

Capponi, A.M. and M.B. Vallotton (1976).

Renin release by rat kidney slices incubated in vitro; role of sodium and of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors, and effect of vincristine.  
Circ.Res. 39: 200.

Carpenter, C.C.J., J.O. Davis and C.R. Ayers, with the surgical assistance of A. Casper (1961).

Relation of renin, angiotensin II, and experimental renal hypertension to aldosterone secretion.  
J.Clin.Invest. 49: 2026.

Carrière, S. (1969).

Effect of norepinephrine, isoproterenol, and adrenergic blockers upon the intrarenal distribution of blood flow.  
Canad.J.Physiol.Pharmacol. 47: 199.

- Chinn, R.H. and G. Düsterdieck (1972).  
The response of blood pressure to infusion of angiotensin II: relation to plasma concentrations of renin and angiotensin II.  
Clin.Sci. 42: 489.
- Chiu, A.T. and M.J. Peach (1974).  
Inhibition of induced aldosterone biosynthesis with a specific antagonist of angiotensin II.  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71: 341.
- Cohen, S., J.M. Taylor, K. Murakami and A.M. Michelakis (1972).  
Isolation and characterization of renin-like enzymes from mouse submaxillary glands.  
Biochemistry 11: 4286.
- Cook, W., D.B. Gordon and W.S. Peart (1956).  
The location of renin in the rabbit kidney.  
J.Physiol. 135: 46<sup>P</sup>.
- Cooke, C.R., T.C. Brown, B.J. Zacherle and W.G. Walker (1970).  
The effect of altered sodium concentration in the distal nephron segments on renin release.  
J.Clin.Invest. 49: 1630.
- Coote, J.H., E.J. Johns, V.H. Macleod and B. Singer (1972).  
Effect of renal nerve stimulation, renal blood flow and adrenergic blockade on plasma renin activity in the cat.  
J.Physiol. 226: 15.
- Cowley, A.W., J.P. Miller and A.C. Guyton (1971).  
Open-loop analysis of the renin-angiotensin system in the dog.  
Circ.Res. 28: 568.

Davis, J.O. (1971).

What signals the kidney to release renin?

Circ.Res. 28: 301.

Davis, J.O., J. Urquhart and J.T. Higgins Jr. (1964).

Renin, angiotensin and aldosterone in experimental secondary hyperaldosteronism.

Canad.Med.Ass.J. 90: 245.

Day, R.P., J.A. Luetscher and C.M. Gonzales (1975).

Occurrence of big renin in human plasma, amniotic fluid and kidney extracts.

J.Clin.Endocrinol.Metab. 40: 1078.

Deheneffe, J., V. Cuesta, J.D. Briggs, J.J. Brown,

B.J. Leckie, A.F. Lever, J.J. Morton, P.F. Semple,

J.I.S. Robertson and M. Tree (1976).

The renin-angiotensin system in anephric man.

Proc.Eur.Dial.Transplant.Assoc. 13: 495.

Derkx, F.H.M., G.J. Wenting, A.J. Man in 't Veld,

J.M.G. Van Gool, R.P. Verhoeven en M.A.D.H. Schalekamp (1976).

Inactive renin in human plasma.

Lancet II: 496.

Edelman, R. and P.M. Hartroft (1961).

Localization of renin in juxtaglomerular cells of rabbit and dog through the use of the fluorescent-antibody technique.

Circ.Res. 9: 1069.

Fray, J.C.S. (1976).

Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney.

Am.J.Physiol. 231: 936.

Ganten, D., A. Marquez-Julio, P. Granger, K. Hayduk,  
K.P. Karsunky, R. Boucher and J. Genest (1971).  
Renin in dog brain.  
Am.J.Physiol. 221: 1733.

Gavras, H., J.J. Brown, A.F. Lever and J.I.S. Robertson  
(1970).

Changes of renin in individual glomeruli in response to  
variations of sodium intake in the rabbit.  
Clin.Sci. 38: 409.

Glenn, F., C.G. Child and G.J. Heuer (1937).  
Production of hypertension by constricting the artery of  
a single transplanted kidney; an experimental investigation.  
Ann.Surg. 106: 848.

Goldblatt, H., J. Gross and R.F. Hanzal (1937).  
Studies on experimental hypertension. II. The effect  
of resection of splanchnic nerves on experimental renal  
hypertension.  
J.Exp.Med. 65: 233.

Goldblatt, H., J. Lynch, R.F. Hanzal and W.W. Summerville  
(1934).  
Studies on experimental hypertension. I. The production of  
persistent elevation of systolic blood pressure by means  
of renal ischemia.  
J.Exp.Med. 59: 347.

Goormaghtigh, N. (1939).  
Existence of an endocrine gland in the media of the  
renal arterioles.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 42: 688.

- Gordon, R.D., O. Küchel, G.W. Liddle and D.P. Island (1967).  
Role of the sympathetic nervous system in regulating renin and aldosterone production in man.  
J.Clin.Invest. 46: 599.
- Helmer, O.M. and I.H. Page (1939).  
Purification and some properties of renin.  
J.Biol.Chem. 127: 757.
- Hesse, B. and I. Nielsen (1977).  
Suppression of plasma renin activity by intravenous infusion of antidiuretic hormone in man.  
Clin.Sci.Mol.Med. 52: 357.
- Hodge, R.L., K.K.F. Ng and J.R. Vane (1967).  
Disappearance of angiotensin from the circulation of the dog.  
Nature 215: 138.
- Horiuchi, K., H. Tanaka, K. Yamamoto and J. Ueda (1971).  
Distribution of renin in the dog kidney.  
Life Sci. 16: 727.
- Hsu, C.H., T.W. Kurtz, H.G. Preuss and J.M. Weller (1975).  
Measurement of renal blood flow in the rat.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 149: 470.
- Johns, E.J., H.K. Richards and B. Singer (1975).  
Effects of adrenaline, noradrenaline, isoprenaline and salbutamol on the production and release of renin by isolated renal cortical cells of the cat.  
Br.J.Pharmacol. 53: 67.
- Johnson, J.A., J.O. Davis and R.W. Gotshall (1976).  
Evidence for an intrarenal beta receptor in control of renin release.  
Am.J.Physiol. 230: 410.

- Kaloyanides, G.J., R.D. Bastron and G.F. Dibona (1973).  
Effect of ureteral clamping and increased renal arterial pressure on renin release.  
Am.J.Physiol. 225: 95.
- Koch-Weser, J. (1976).  
Hydralazine.  
New Engl.J.Med. 295: 320.
- Kolff, W.J. (1958).  
Discussion of reports on renal factors in hypertension.  
Circulation 17: 676.
- Kono, T., F. Oseko, S. Shimpo, M. Nanno and J. Endo (1975).  
Biological activity of des-asp<sup>1</sup>-angiotensin II (angiotensin III) in man.  
J.Clin.Endocrinol.Metab. 41: 1174.
- Krieger, E.M. (1964).  
Neurogenic hypertension in the rat.  
Circ.Res. 15: 511.
- Kurtz, T.W., R.M. Maletz and C.H. Hsu (1976).  
Renal cortical blood flow in glycerol-induced acute renal failure in the rat.  
Circ.Res. 38: 30.
- Laragh, J.H., M. Angers, W.G. Kelly and S. Lieberman (1960).  
Hypotensive agents and pressor substances; the effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II and others on the secretory rate of aldosterone in man.  
J.Am.Med.Assoc. 174: 234.
- Leckie, B.J. and A. McConnell (1975).  
A renin inhibitor from rabbit kidney; conversion of a large inactive renin to a smaller active enzyme.  
Circ.Res. 36: 513.

Leenen, F.H.H., D.P. Redmond and R.H. McDonald Jr.(1975).  
Alpha and beta adrenergic-induced renin release in man.  
Clin.Pharmacol.Ther. 18: 31.

Leloir, L.F., J.M. Munoz, A.C. Taquini, E. Braun-Menendez  
and J.C. Fasciolo (1942).  
La formacion del hipertensinogen.  
Rev.Argent.Cardiol. 9: 269.

Lowe, R.D. (1964).  
Factors controlling the release of renin from the kidney.  
Lancet II: 183.

Lumbers, E.R. (1971).  
Activation of renin in human amniotic fluid by low pH.  
Enzymologia 40: 329.

McIntosh, H.D., J.F. Burnum, J.B. Hickam and J.V. Warren  
(1954).  
Circulatory changes produced by the Valsalva maneuver in  
normal subjects, patients with mitral stenosis, and auto-  
nomic nervous system alterations.  
Circulation 9: 511.

McManus, J.F.A. (1944).  
The Golgi element in the cells of the first and second  
convoluted tubules of the cat kidney.  
Quart.J.Microscop.Sci. 85: 97.

Michelakis, A.M. (1971).  
The effect of angiotensin on renin production and release  
in vitro.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 138: 1106.

Michelakis, A.M. and R.G. McAllister (1972).  
The effect of chronic adrenergic receptor blockade on  
plasma renin activity in man.  
J.Clin.Endocrinol.Metab. 34: 386.

- Michelakis, A.M., J. Caudle and G.W. Liddle (1969).  
In vitro stimulation of renin production by epinephrine,  
norepinephrine, and cyclic AMP.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 130: 748.
- Morris, B.J. and C.I. Johnston (1976).  
Isolation of renin granules from rat kidney cortex and  
evidence for an inactive form of renin (prorenin) in  
granules and plasma.  
Endocrinology 98: 1466.
- Müller, J. and L. Barajas (1972).  
Electron microscopic and histochemical evidence for a  
tubular innervation in the renal cortex of the monkey.  
J.Ultrastruct.Res. 41: 533.
- Nash, F.D., H.H. Rostorfer and M.D. Bailie (1968).  
Relation to renal sodium load and dissociation from  
hemodynamic changes.  
Circ.Res. 22: 473.
- Oparil, S. and E. Haber (1974).  
The renin-angiotensin system (Part I).  
New Engl.J.Med. 291: 389.
- Page, I.H. and O.M. Helmer (1940).  
A crystalline pressor substance (angiotensin) resulting  
from the reaction between renin and renin-activator.  
J.Exp.Med. 71: 29.
- Passo, S.S., T.A. Assaykeen, K. Otsuka, B.L. White,  
A. Goldfein and W.F. Ganong (1971).  
Effect of stimulation of the medulla oblongata on renin  
secretion in dogs.  
Neuroendocrinology 7: 1.



- Peach, M.J. and A.T. Chiu (1974).  
Stimulation and inhibition of aldosterone biosynthesis  
in vitro by angiotensin II and analogs.  
Circ.Res. 34, Suppl. I: 7.
- Peart, W.S. (1975).  
Renin-angiotensin system.  
New Engl.J.Med. 292: 302.
- Perry, H.M., P. Comens and A. Yunice (1962).  
Distribution of hydralazine-I-C<sup>14</sup> after injection into  
normal mice.  
J.Lab.Clin.Med. 59: 456.
- Pettinger, W.A., W.B. Campbell and K. Keeton (1973).  
Adrenergic component of renin release induced by vaso-  
dilating antihypertensive drugs in the rat.  
Circ.Res. 33: 82.
- Pettinger, W.A. and K. Keeton (1975).  
Altered renin release and propranolol potentiation of  
vasodilatory drug hypotension.  
J.Clin.Invest. 55: 236.
- Pettinger, W.A., T.K. Keeton and W.B. Campbell (1976).  
Evidence for a renal  $\alpha$ -adrenergic receptor inhibiting  
renin release.  
Circ.Res. 38: 338.
- Pettinger, W.A., K. Tanaka, K. Keeton, W.B. Campbell  
and S.N. Brooks (1975)<sup>a</sup>.  
Renin release, an artefact of anesthesia and its  
implications in rats.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 148: 625.

- Pickering, G.W. and M. Prinzmetal (1938).  
Some observations on renin, a pressor substance contained  
in normal kidney, together with a method for its  
biological assay.  
Clin.Sci. 3: 211.
- Pitcock, J.A., P.M. Hartroft and L.N. Newmark (1959).  
Increased renal pressor activity (renin) in sodium  
deficient rats and correlation with juxtaglomerular  
cell granulation.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 100: 868.
- Provoost, A.P. (1976).  
Hypertensie en het sympathisch zenuwstelsel. Een onderzoek  
naar de invloed van neonatale sympathectomie op het ont-  
staan van experimentele hypertensie bij de rat.  
Proefschrift Utrecht, blz. 73.
- Reid, I.A. (1977).  
Is there a brain renin-angiotensin system?  
Circ.Res. 41: 147.
- Rajo-Ortega, J.M., P. Granger, R. Boucher and J. Genest  
(1970).  
Studies on the distribution of the JGI in the renal  
cortex of dogs and beavers.  
Nephron 7: 61.
- Sasaki, Y. and H.N. Wagner Jr. (1971).  
Measurement of the distribution of cardiac output in  
unanesthetized rats.  
J.Appl.Physiol. 30: 879.
- Sealy, J.E., C. Moon, J.H. Laragh and M. Alderman (1976).  
Plasma prorenin; cryoactivation and relationship to  
renin substrate in normal subjects.  
Am.J.Med. 61: 731.

Shade, R.E., J.O. Davis, J.A. Johnson and R.T. Witty (1972).

Effects of renal arterial infusion of sodium and potassium on renin secretion in the dog.

Circ.Res. 31: 719.

Shade, R.E., J.O. Davis, J.A. Johnson, R.W. Gotshall and W.S. Spielman (1973).

Mechanism of action of angiotensin II and antidiuretic hormone on renin secretion.

Am.J.Physiol. 224: 926.

Skeggs, L.T., F.E. Dorer, J.R. Kahn, K.E. Lentz and M. Levine (1976).

The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension.

Am.J.Med. 60: 737.

Skinner, S.L. (1967).

Improved assay methods for renin "concentration" and "activity" in human plasma. Methods using selective denaturation of renin substrate.

Circ.Res. 20: 391.

Skinner, S.L., E.J. Cran, R. Gibson, R. Taylor, W.A.W. Walters and K.J. Catt (1975).

Angiotensins I and II, active and inactive renin, renin substrate, renin activity, and angiotensinase in human liquor amnii and plasma.

Am.J.Obstet.Gynecol. 121: 626.

Skinner, S.L., J.W. McCubbin and I.H. Page (1963).

Renal baroreceptor control of renin secretion.

Science 141: 814.

Skinner, S.L., J.W. McCubbin and I.H. Page (1964).  
Control of renin secretion.  
Circ.Res. 15: 64.

Strang, K.D., R. Vandongen, M.H. Poessé and  
W.H. Birkenhäger (1977).  
Failure of  $\alpha$ -adrenergic stimulation by phenylephrine to  
enhance renin secretion in the isolated rat kidney.  
Eur.J.Pharmacol. 45: 141.

Tanigawa, H., D.J. Allison and T.A. Assaykeen (1972).  
A comparison of the effects of various catecholamines  
on plasma renin activity alone and in the presence of  
adrenergic blocking agents.  
In: Hypertension '72; ed. by J. Genest and E. Koiw.  
Berlin, Springer Verlag. pp 37.

Taquini, A.C., P. Blaquier and A.C. Taquini Jr. (1964).  
On the production and role of renin.  
Canad.Med.Ass.J. 90: 210.

Teichmann, G., G. Dührkop, H. Bellin, D. Jung, H. Börner  
und G. Rostock (1974).  
Hämodynamische Regulation des Hochdruckherzens unter  
intravenöser Anwendung von Dihydralazin.  
Z.Gesamte Inn.Med. 29: 1030.

Thurau, K. und J. Schnermann (1965).  
Die Natriumkonzentration an den Macula densa-Zellen  
als regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat  
(Mikropunktionsversuche).  
Klin.Wschr. 43: 410.

Tigerstedt, R. und P.G. Bermann (1898).  
Niere und Kreislauf.  
Skand.Arch.Physiol. 8: 223.

Tobian, L. (1969).

Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular cells, and hypertension.

Physiol.Rev. 40: 280.

Tobian, L., J. Janeczek and A. Tomboulian (1959).

Correlation between granulation of juxtaglomerular cells and extractable renin in rats with experimental hypertension.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 100: 94.

Ueda, H., Y. Kaneko, T. Takeda, T. Ikeda and S. Yagi (1970).

Observations on the mechanism of renin release by hydralazine in hypertensive patients.

Circ.Res. 26/27, Suppl. II: 201.

Ueda, H. H. Yasuda and Y. Takabataka (1967).

Increased renin release evoked by mesencephalic stimulation in the dog.

Jap.Heart J. 8: 498.

Vander A.J. (1965).

Effect of catecholamines and the renal nerves on renin secretion in anesthetized dogs.

Am.J.Physiol. 209: 659.

Vander, A.J. (1967).

Control of renin release.

Physiol.Rev. 47: 359.

Vander, A.J. and R. Miller (1964).

Control of renin secretion in the anesthetized dog.

Am.J.Physiol. 207: 537.

Vandongen, R. (1975)<sup>a</sup>.

Direct intrarenal action of catecholamines on renin secretion.

Clin.Exp.Pharmacol.Physiol. 18, Suppl. 2: 103.

Vandongen, R. (1975).

Inhibition of renin secretion in the isolated rat kidney by antidiuretic hormone.

Clin.Sci.Mol.Med. 49: 73.

Vandongen, R. and D.M. Greenwood (1975)<sup>b</sup>.

The stimulation of renin secretion by non-vasoconstrictor infusions of adrenaline and noradrenaline in the isolated rat kidney.

Clin.Sci.Mol.Med. 49: 609.

Vandongen, R., D.M. Greenwood, K.D. Strang, M.H. Poessé and W.H. Birkenhäger (1976).

Effects of vaso-active substances on renin secretion in the isolated rat kidney.

In: Interference with mechanisms in hypertension; ed. by W.H. Birkenhäger and R. Vandongen. Rotterdam. pp 5.

Vandongen, R. and W.S. Peart (1974).

Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat.

Br.J.Pharmacol. 50: 125.

Vandongen, R. and W.S. Peart (1974)<sup>a</sup>.

The inhibition of renin secretion by alpha-adrenergic stimulation in the isolated rat kidney.

Clin.Sci.Mol.Med. 47: 471.

Vandongen, R., W.S. Peart and G.W. Boyd (1973).

Adrenergic stimulation of renin secretion in the isolated perfused rat kidney.

Circ.Res. 32: 290.

Vandongen, R., M.H. Poessé, K.D. Strang and  
W.H. Birkenhäger (1977).

Evidence that "inactive" renin is produced outside  
the kidney of the rat.

Clin.Sci.Mol.Med. 53: 189.

Voudoukis, I.J. (1966).

On the role of hydralazine in renal hemodynamics and  
secretion of renin.

Am.Heart J. 72: 140.

Weber, M.A., G.S. Stokes and J.M. Gain (1974).

Comparison of the effects on renin release of beta  
adrenergic antagonists with differing properties.

J.Clin.Invest. 54: 1413.

Weinberger, M.H., W. Aoi and D.P. Henry (1975).

Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin  
release by the rat kidney slice in vitro.

Circ.Res. 37: 318.

Weinberger, M.H., W. Aoi, M.B. Wade, T. Usa, C.E. Grim,  
M.E. Dentino and F. Luft (1976).

Renin-like activity (RLA) in anephric man.

Kidney Int. 10: 537 (Abstr.).

Werner, U., H. Günnewig and K.D. Bock (1975).

Relationships between plasma renin activity and  
urinary and plasma catecholamines.

Clin.Sci.Mol.Med. 48, Suppl. 2: 287<sup>S</sup>.

Winer, N., D.S. Chokshi, M.S. Yoon, S. Deenbandhu and  
A.D. Freedman (1969).

Adrenergic receptor mediation of renin secretion.

J.Clin.Endocrinol.Metab. 29: 1168.

Worcel, M. P. Meijer, G.A. D'Auriac and P. Milliez  
(1969).

Role of angiotensin in normal blood pressure  
regulation.

Pflueger Arch. 310: 251.

Zacest, R. and J. Koch-Weser (1972).

Relation of hydralazine plasma concentration to dosage  
and hypotensive action.

Clin.Pharmacol.Ther. 13: 420.

Zehr, J.E. and E.O. Feigl (1973).

Suppression of renin activity by hypothalamic stimulation.  
Circ.Res. 27/28, Suppl. I: 17.

Ziegler, M. and F. Gross (1964).

Effect of blood volume changes on renin-like activity  
in blood.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 116: 774.

Zwieten, P.A. van (1968).

Pharmakologische und biochemische Wirkungen von  
Hydralazin und Dihydralazin.

Arzneimittelforschung 18: 79.



## CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd in 1945 te 's-Gravenhage geboren.

Hij bezocht het Openbaar Dalton Lyceum (H.B.S.-B) te Voorburg.

Zijn medische studie volgde hij aan de medische faculteit van Rotterdam, waar hij tot de eerste groep studenten behoorde die daar hun studie begonnen. Het artsdiploma werd in september 1972 behaald.

Vanaf datzelfde jaar volgde hij zijn opleiding in de inwendige geneeskunde bij Prof.Dr. W.H. Birkenhäger in het Zuiderziekenhuis te Rotterdam.

In 1977 volgde inschrijving in het specialisten register.

De promovendus is thans werkzaam als chef de clinique bij Prof.Dr. W.H. Birkenhäger in het Zuiderziekenhuis.

## NAWOORD

Dit onderzoek vond plaats in de periode 1975-1977 in directe samenwerking met Bob Vandongen, waarbij geput kon worden uit zijn niet aflatend enthousiasme en zijn wetenschappelijke- en technische kennis.

Prof.Dr. W.H. Birkenhäger schiep de faciliteiten voor het onderzoek en heeft het onderzoek en de wording van dit proefschrift kritisch begeleid.

Dr. M.A.D.H. Schalekamp en Prof.Dr. J.C. Birkenhäger hebben mij een aantal waardevolle aanwijzingen gegeven. Marianne Poessé, medewerkster van het eerste uur en Julia Vaarties-Steeman wil ik bedanken voor hun technische bijdrage en hun enthousiasme, waarbij zij dikwijls meer werk verzetten dan verwacht had mogen worden.

Irene Drost-Planqué typte en hertypete het manuscript met een positieve bijdrage in de vormgeving.

De heer R.O. Hatt verzorgde het grafische gedeelte, waarbij in overleg naar de meest sprekende vorm werd gezocht.

De heer W.C. Trumpie zorgde voor een continu aanbod van uitstekende proefdieren.

De dames I. v.d. Bergh-Snoek en S. Boer, werkzaam op de medische bibliotheek wil ik bedanken voor het controleren en alphabetiseren van de literatuurlijst.

Ook allen niet met name genoemd, die indirect hebben meegewerkt aan de totstandkoming van dit proefschrift wil ik hierbij bedanken.